

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

Polifenoles y dendrímeros de triptófano como inhibidores del proceso de entrada-fusión del VIH

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva María Rivero Buceta

Directores

Ana San-Félix García
María José Camarasa Rius

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



POLIFENOL Y DENDRÍMEROS DE TRIPTÓFANO COMO INHIBIDORES DEL PROCESO DE ENTRADA/FUSIÓN DEL VIH

EVA MARÍA RIVERO BUCETA

2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



POLIFENOLES Y DENDRÍMEROS DE TRIPTÓFANO COMO INHIBIDORES DEL PROCESO DE ENTRADA/FUSIÓN DEL VIH

Memoria que para obtener el grado de Doctor en Química presenta

EVA MARÍA RIVERO BUCETA

2014

AGRADECIMIENTOS

Esta página comenzó a escribirse tras una llamada mientras hacía el Camino de Santiago, y cuatro años después, aquí estoy, presentando una tesis doctoral, lo cual no significa que la investigación haya terminado, ni mucho menos, esto acaba de empezar. Es por ello que en estas líneas quiero agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado durante estos 4 años, tanto profesional como personalmente.

El trabajo que presento en esta memoria ha sido realizado en el Instituto de Química Médica bajo la dirección de la Dra. Ana San-Félix y María José Camarasa. A María José quiero agradecerle el que me dejara formar parte de su grupo de investigación y me permitiera aprender y madurar en lo profesional y en lo personal, confirmando mi pasión por el mundo de la Química y el “cacharreo”.

A Ana, la verdad es que no sé por dónde empezar o qué decir porque resumir cuatro años es muy complicado. A ella le quiero agradecer, en primer lugar, su apoyo, su constancia, su ayuda y dedicación en todo este tiempo. La verdad es que han sido intensos, con nuestras experiencias buenas y malas, con esas batallas con las precipitaciones, el hidrogenador, el Ni/Raney...y nunca podré olvidar su buen hacer con el nitrógeno líquido. Mil gracias por esos consejos, esos abrazos cuando la cosa se torcía, por tener siempre una sonrisa y nunca una mala cara, por el cariño y por el haberme acogido como una madre. Ha sido una experiencia enriquecedora y un privilegio para mí el poder trabajar al lado de una persona tan cercana, constante, perfeccionista, trabajadora y lo más importante, humana, todo un ejemplo para mí a seguir en cualquier ámbito de la vida. Una persona excepcional como pocas. Y espero que nunca olvides que hay que darlo todo cada segundo!

Quiero agradecer al resto de jefas o “compis de mesa” por hacerme sentir una más entre ellas, por todas las comidas juntas, por las risas, las conversaciones, por el poder meterse con ellas desde el cariño sin que ninguna se lo haya tomado a mal. Además, he recibido de todas vosotras (M^a Tere, Pérez-Pérez, Pérez de Vega, Sonsoles, Mercedes, Marta, Eva, Ana) grandes consejos a nivel profesional y personal y mucho cariño, haciendo que tantas horas en el trabajo fueran mucho más fáciles.

A Elisa, por ser “mi profesora”, por esa mano que me echó en vitrina, por ser mi ayuda, mi apoyo y por su inestimable paciencia al tener que enseñar a una persona recién salida de la

universidad. Ha sido fantástico aprender al lado de alguien tan detallista, cuidadosa, paciente y sobre todo buena persona. ¡Un lujo!

A Gloria, por ser un apoyo único y una gran amiga, por tener siempre ese abrazo...al final era imposible resistirse, jaja. Gracias por tener siempre tiempo para ayudar, por quedarte hasta tarde y así no tener “miedito” en el laboratorio, por las conversaciones...no puedo decir todo lo que pienso pero ya sabes lo mucho que te quiero y eso es lo más importante. Además, te has convertido en una persona muy importante y eso es un regalo que me ha dado la tesis.

A Sonia, o mi Marisoni, con todo el cariño de este mundo, por estar cada día a mi lado y enseñarme todo lo que sabe, a veces más o menos friki, por hacer que esta aventura cada día tuviera su punto, sus risas...por martirizarme con la música, jaja, por ayudarme siempre con todos los problemas que fueron apareciendo y por el cariño que me has dado...un placer mi niña!

A Vane y a mi familia mañica, increíble experiencia el haberte conocido y eso sí que se lo debo a la tesis. Fue un año muy intenso pero del que me quedo con todo: conversaciones, alguna escapadita, risas, abrazos...y de paso me llevé otra “familia”.

A Nuria, por ser mi primera compi de piso y vivir esta aventura desde el inicio, por estar a mi lado siempre en los buenos y malos momentos, porque son muchos los momentos que hemos vivido y porque siempre me ha apoyado. Mil gracias!!!!

A Ernesto, además de a estas cuatro grandes personas, tengo que darles las gracias y una mención especial por haber aguantado horas y horas de música “chunda, chunda” con DJ Tiesto, Armin van Buuren... ya casi son como de la familia.

Al Dr. Jan Balzarini, por acogerme en su laboratorio y dejarme aprender y disfrutar de los ensayos biológicos. Al fin los valores que veíamos o nos enviaban empezaban a tener sentido. Por su apoyo a nivel personal y por sus discusiones científicas con las que he aprendido a valorar e interpretar los resultados .¡Inolvidable experiencia!

Al Dr. Jesús Quintanilla por su inestimable ayuda para encontrar mis masas exactas, por compartir su conocimiento científico, por su paciencia y por su perfección en el trabajo, que no le permiten abandonar las cosas sin haberlo intentado todo, y porque sin su ayuda este trabajo habría sido muy complicado.

A la Dra. Raquel Mateos y a la Dra. Laura Bravo por acogerme en su laboratorio y enseñarme que el mundo de los antioxidantes puede ser interesante y que hay algo más allá de la Química Orgánica. Y en especial agradecer a Raquel el que se pusiera conmigo a hacer los experimentos cuando las cosas parecían no salir bien, por ser tan constante, por estar siempre disponible y sobre todo por ser tan cercana y tratarme como a una más, como alguien conocido. ¡Una gran experiencia!

Me gustaría dar las gracias a mi grupo de investigación, al IQM en general y a todo el personal del Centro de Química “Manuel Lora Tamayo” sin cuya ayuda no podría haber llevado a cabo esta Tesis Doctoral, al Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, al Laboratorio de Espectrometría de Masas y a todas las personas que trabajan por el buen funcionamiento del Centro, haciendo que el día a día sea muy sencillo.

Cómo no, a mi familia (Ra, la abuela, la tía, Manu, Eva y los peques), porque pese a vivir un pelín lejos, aunque en la tierra más bonita, ¡Galicia terra única, Galicia calidade!, las visitas a casa son maravillosas con sus comilonas en el pueblo, las vendimias, el albariño, la cocina de la tía... ¡Sois mi mejor tesoro!

A mis padres, Virginia y Felipe, que estén siempre ahí, para lo que sea, apoyándome en todas mis decisiones, en mis proyectos, en mis viajes... poniéndomelo fácil y sobre todo, por ser esa “beca papis” cuando al Ministerio se le olvidaba pagar las nóminas. Nunca os podréis imaginar lo que os quiero.

A mi hermana, Virginia, Vivi cariñosamente. La verdad es que ella es la culpable de que hoy esté aquí presentando este trabajo. Ella me hizo pedir la beca, cuando la Química por ciertas experiencias había dejado de ser una prioridad para mí, aunque no me dejó desistir al saber que esto me encanta. Además, ese apoyo incondicional cada día, esos consejos, esa ayuda... todo es más sencillo con la hermana mayor tan cerca. Ya sabes que te adoro, al igual que a Javi y a Pablo. El pequeñín nos ha cambiado la vida y como nos la alegra.

Finalmente, quiero agradecer a Gonzalo, el que me haya aguantado en la etapa más dura de la tesis. Además, gracias por tu infinita paciencia, por ser mi amigo y apoyo.

¡Muchísimas gracias a todos!

The entry of Human Immunodeficiency Virus (HIV) into target cells represents one of the most attractive targets for the development of anti-HIV compounds. In fact, compounds that interfere with this event may represent an advantage over other existing therapeutic approaches that target the viral enzymes such as reverse transcriptase or protease, as they may prevent virus entry into target cells and subsequently reduce the number of latent reservoirs for HIV.

HIV entry into host cells is mediated by the viral envelope glycoproteins gp120 and gp41, which interact with CD4 receptor of the T cell surface. Viral gp120 is of particular importance during viral fusion and entry as it serves as the first contact point with the host cell. This envelope glycoprotein is the main target for neutralizing antibodies that appear during natural infection. The HIV gp120 protein is extensively glycosylated, so that approximately 50% of its molecular weight is due to a dense carbohydrate (glycan) array. These carbohydrates act as a “protective shield” that hides the virus from the host immune system.

Some lectins, proteins of natural origin that bind carbohydrates, show a potent inhibitory activity against HIV. These lectins exert their anti-HIV activity in the early steps of the replicative cycle by binding to the gp120 carbohydrates. Previous studies demonstrated that prolonged exposure to lectins results in the emergence of drug resistance. Mutations that appear under the pressure of these lectins predominantly affect the N-glycosylation sites of gp120. Consequently the previously hidden immunogenic epitopes of gp120 become exposed and, therefore, the host immune system may produce neutralizing antibodies against them.

These experimental results led us to propose a conceptually entirely new chemotherapeutic approach for anti-HIV therapy based on targeting the carbohydrates of the gp120 glycoprotein. Accordingly, carbohydrate-binding agents might have a dual mechanism of antiviral action: a direct antiviral activity by preventing HIV entry and transmission to its target cells, and an indirect antiviral activity by forcing HIV to delete glycans from gp120. The latter phenomenon will result in creating “holes” in the protective glycan shield of the HIV envelope, whereby the host immune system may become triggered to produce neutralizing antibodies against previously hidden immunogenic epitopes of gp120.

Lectins suffer from a number of drawbacks, including high molecular weight and peptidic nature, that may compromise their development as therapeutic agents. Therefore it

would be desirable to find smaller non-peptidic molecules or “lectin mimetics” that behave in a similar way as lectins do in their interaction with the viral gp120.

In the design of the novel synthetic “lectin mimetics”, the following should be considered: first, the binding between lectins and carbohydrates is weak in nature. Secondly, high affinity binding is achieved through multivalency, where the high number of simultaneous binding events compensates the lack of strength of an individual interaction. And, finally, the protein-carbohydrate interactions are non-covalent and involve hydrogen bonding, Van der Waals forces, interactions of sugars CHs with aromatic residues of the protein and/or metal coordination.

The work performed by our group to discover “lectin mimetics” has led to the identification of two different hits (**AL-170** and **AL-195**) (Figure 1) with significant anti-HIV activity. In the present work we considered of interest to: (a) optimize these two hits in order to improve their potency and decrease their toxicity, (b) gain further insights into their interaction with the viral glycoproteins gp120 and the carbohydrates present on its surface by SPR (Surface Plasmon Resonance) and (c) find novel synthetic “lectin mimetics”.

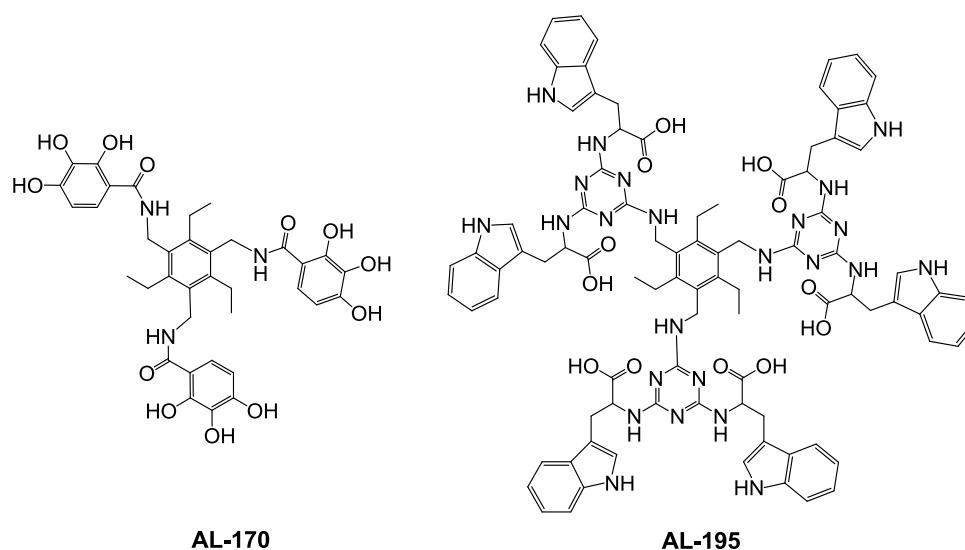
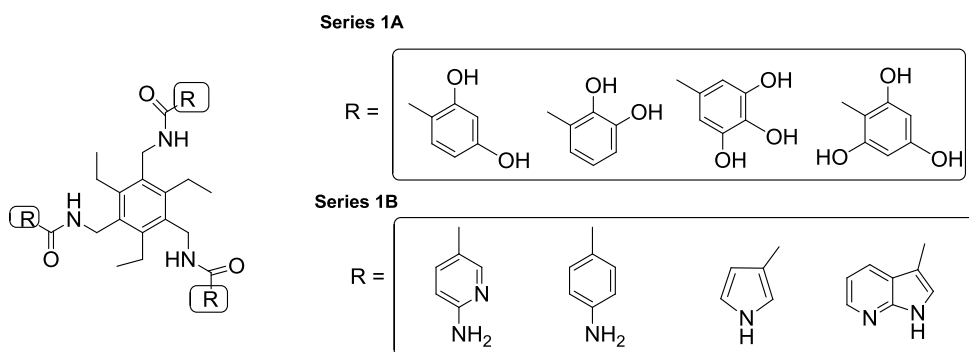


Fig. 1. Structure of the prototypes AL-170 and AL-195

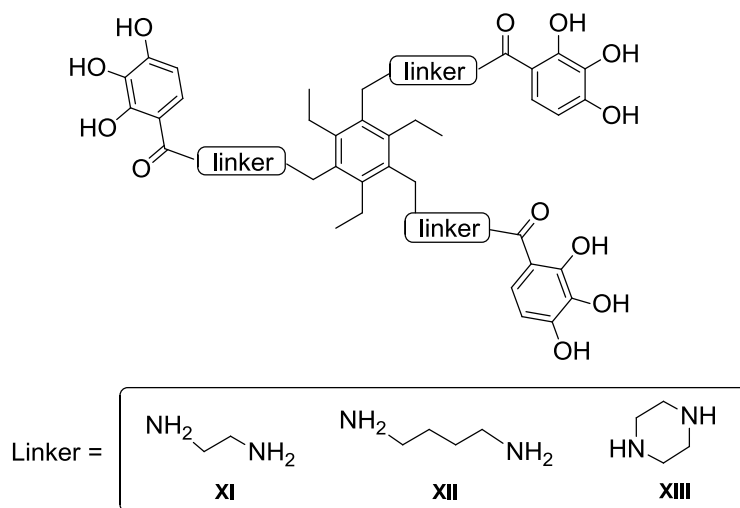
With these goals two families of compounds have been prepared:

1) Triethylbenzene derivatives (Chapter 1). To optimize prototype AL-170 a first series of compounds with a triethylbenzene scaffold substituted with phenolic rings with 2 or 3 OHs at different position on the aromatic ring were prepared (Series 1A). The amphipatic character of

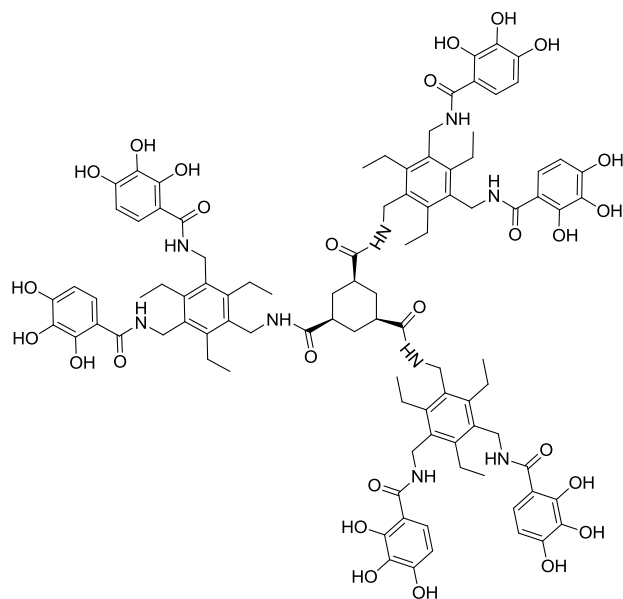
these phenolic rings can be useful to establish CH/ π interactions and hydrogen-bonds with the carbohydrates of the viral envelope. In addition, aminopyridine, aniline, pyrrole and 7-azaindole moieties, which are well-established H-bonding donors, were incorporated as substituents of the triethylbenzene scaffold (Series 1B). The aromatic ring present in these compounds is expected to participate in CH/ π interactions with the viral carbohydrates thus providing additional stabilization.



Next, compounds in which the distance between the phenolic rings and the central skeleton has been extended with respect to the prototype **AL-170** through spacers of two and four methylenes or piperazine were prepared (Series 2).

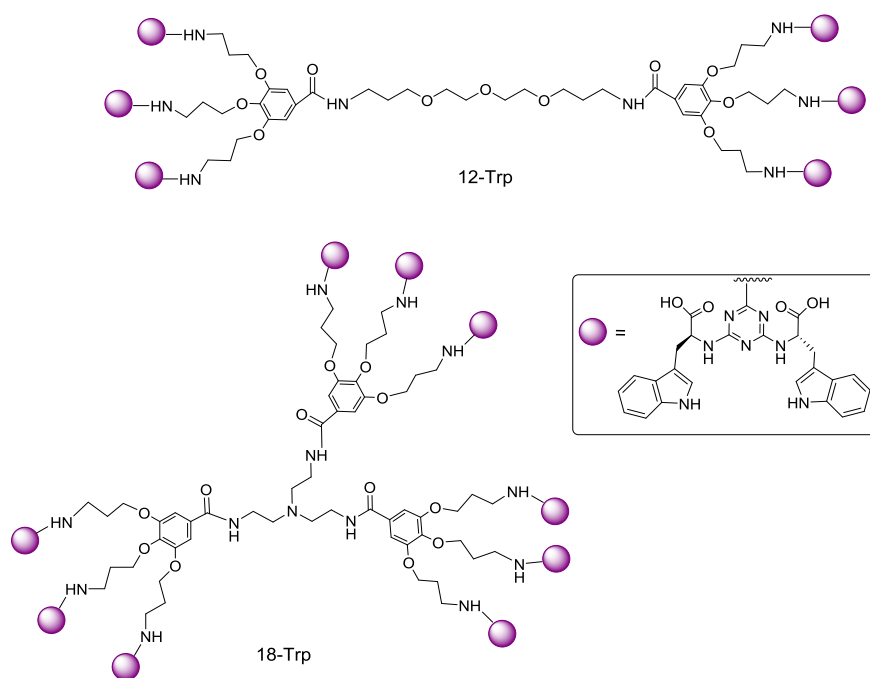


Finally, multiple phenolic moieties were incorporated around the triethylbenzene scaffold to “emulate” the multiple interactions that lectins establish with carbohydrates (Series 3).



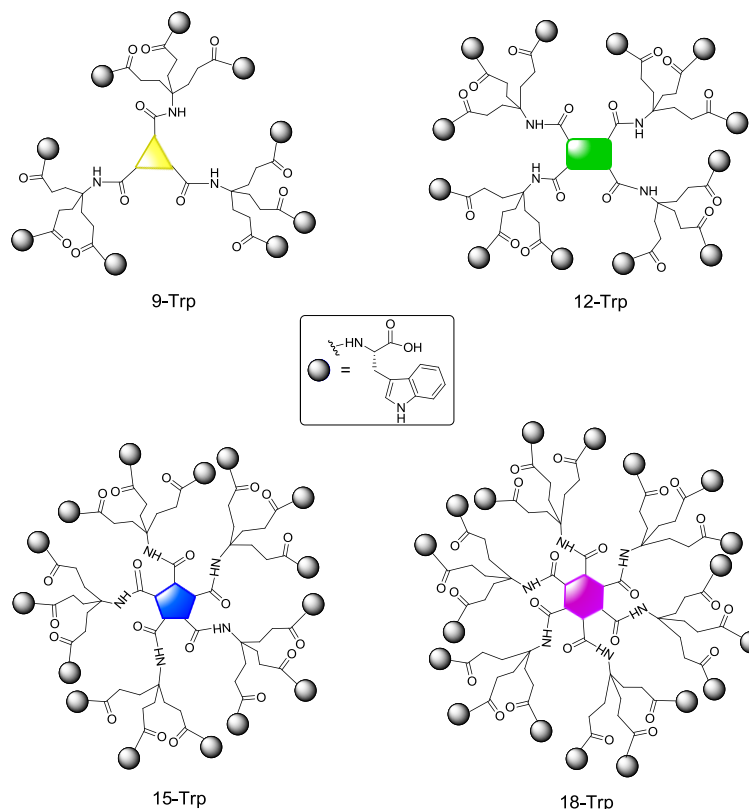
Series 3

2) Tryptophan dendrimers (Chapter 2). To optimize prototype **AL-195** a second family of compounds with 9, 12, 15 and 18 tryptophans on the surface have been prepared. First, compounds with triazine rings (present in the prototype AL-195) to connect the central scaffold with the tryptophans of the peryphery were prepared (Series 4).



Series 4

In addition, compounds in which multibranching spacers, instead of triazine, were used to connect the central scaffold and the periphery were prepared (Series 5).



Series 5

For the synthesis of the phenolic derivatives of Series 1-3 the corresponding OBn protected benzoic acid derivatives, followed by deprotection under hydrogenation conditions were used. Compounds of series 4 and 5 were prepared using convergent or divergent approaches.

The anti-HIV activity of all the synthesized compounds is presented. In addition SPR (Surface Plasmon Resonance) experiments have been used to evaluate the interaction between these compounds and the envelope glycoprotein gp120 and the carbohydrates present on its surface. These studies were performed by the group of Prof. Jan Balzarini (Rega Institute, Leuven).

From the anti HIV activity results we can conclude the following:

With respect to the phenolic derivatives (Series 1-3), we can conclude that only the prototype **AL-170**, substituted with three 2,3,4-trihydroxybenzoyl moieties as carbohydrate-binding ligands, shows anti HIV activity ($EC_{50} = 6.3 \pm 1.0 \mu M$, $CC_{50} = 184 \pm 14 \mu M$). "Direct" and "undirect" SPR experiments performed with this compound are suggestive for an interaction with the carbohydrates present on gp120 although it was not possible to determine the binding

constant (KD) for this interaction. Our hypothesis is that the preorganized structure of this compound (previously shown by NMR studies) can effectively orient the three phenolic groups attached to the central scaffold (triethylbenzene) to interact with the carbohydrates of the viral surface.

In addition, and taking into consideration that the use of antioxidants have been proposed as an important strategy for controlling, or at least ameliorating, the degree of HIV infection, we decided to investigate the antioxidant properties of the phenolic derivatives of Series 1A. These studies were performed by the group of Prof. Laura Bravo and Raquel Mateos (ICTAN). Several phenolic derivatives of this series showed interesting antioxidant properties resulting from the hydroxyl groups present in its structure.

With respect to the tryptophan dendrimers (Series 4 and 5) it was shown that these compounds significantly inhibit HIV replication and bind to the viral glycoproteins gp120 and gp41 in SPR experiments. Among this family, compound **26c** showed the best antiviral profile (Figure 2). This compound resulted eight-fold more active than the prototype **AL-195**. The binding constant for the interaction of one the best derivatives, **30f**, and glycoprotein gp120 is 6.7 μM (two fold higher than the prototype, Figure 2).

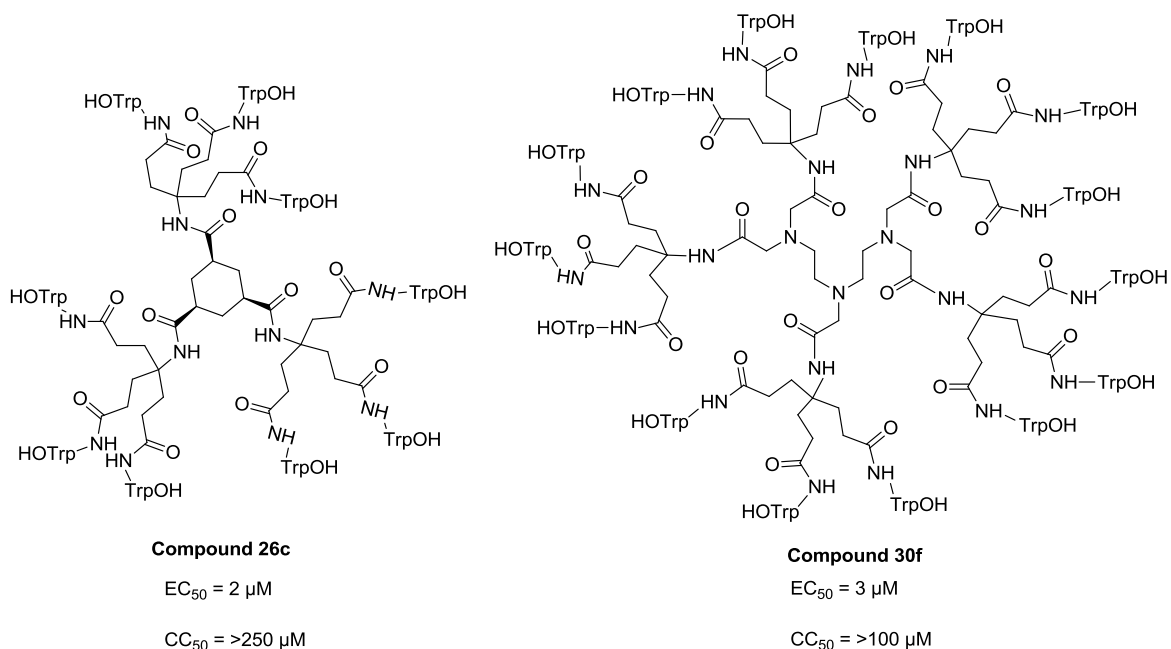


Figure 2. Structure of compounds 26c and 30f

Moreover, the results obtained so far indicate that the triazine ring is not crucial for both, anti-HIV activity and gp120 and gp41 binding. However, tryptophans on the periphery, with their carboxylic acid moieties in the COOH form, are very important for both activity and binding to the viral glycoproteins gp120 and gp41.

Time of addition experiments showed that these compounds inhibit early steps of the HIV replicative cycle. This finding together with their interaction with glycoproteins gp120 and gp41 of the viral envelope support their potential role as entry/fusion inhibitors of HIV. Our hypothesis is that the negative charge (COOH groups) of these compounds might interact through ionic (charge-charge) interactions with positive regions of gp120. In addition some extra interaction should be established through the indol lateral chain of the tryptophan because this amino acid is very important for activity.

All the compounds prepared were also tested against a wide panel of RNA and DNA viruses such as: enterovirus, hepatitis C, chikungunya, etc... by the group of Prof. Johan Neyts (Rega Institute, Leuven).

These biological studies showed that several members (**30e**, **34** and **40**) of the Tryptophan dendrimers (Series 4 and 5) have an unexpected submicromolar activity against enterovirus 71 (EV71) and Echovirus 11 (ECHO 11) (Figure 3). These results are described in the Chapter 3 of the present Thesis. Given the novelty of this result we decided to study with more detail the mechanism of action of these compounds. With this aim selection and characterization of viral resistant strains was performed. Finally, after several passages, two viral resistant strains were obtained. Interestingly two amino acid mutations (Ser 184 Thr y Pro 246 Ser) were observed in the capsid protein VP1 of these mutated virus strains. Our hypothesis is that the negative charge (COOH groups) of our compounds might interact through ionic (charge-charge) interactions with positive regions of the capsid protein VP1, inhibiting the interaction with the cellular receptor and thus the virus entry into the host cell.

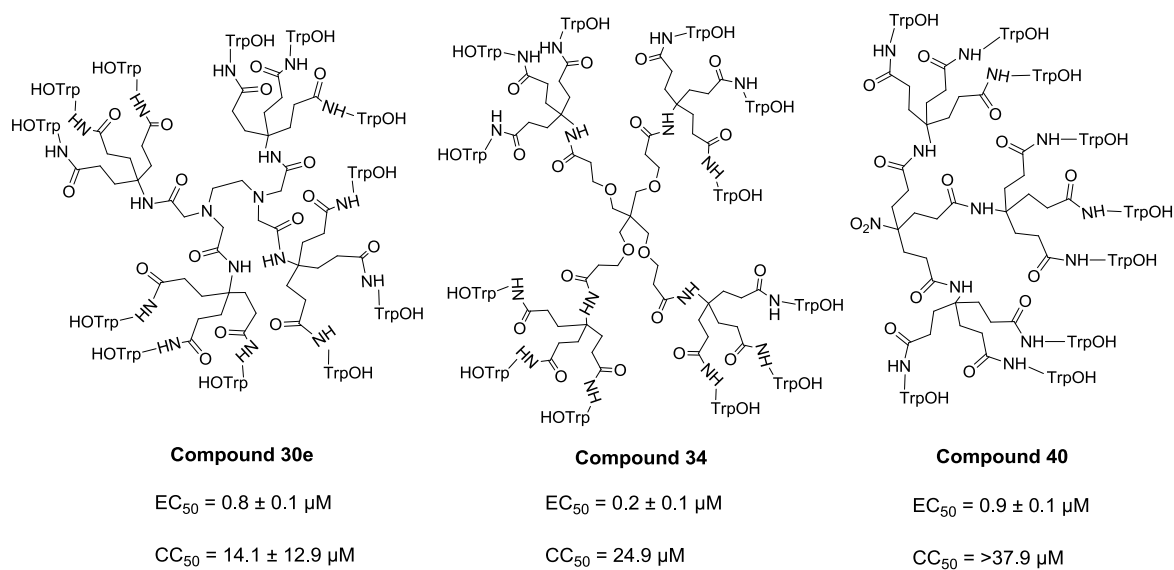


Figure 3. Structure of compounds 30e, 34 and 40

This interesting finding supports the interest in the Tryptophan dendrimers described in this Thesis as novel enterovirus lead compounds that deserve to be studied more in detail.

ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid
AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride
BSA	Albúmina de suero bovino
CAM	Mezcla: ácido molíbdico, cerio sulfato amónico y ácido sulfúrico
CCTLC	Cromatografía circular centrífuga en capa fina
DCM	Diclorometano
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin
DHB	2,5-dihidroxibenzoico
DIPEA	Diisopropiletilamina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ESI	Ionización electrospray
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Ferric reducing ability of plasm
GNA	<i>Galanthus nivalis agglutinin</i> ,
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HHA	<i>Hippeastrum hybryd agglutinin</i>
HPLC	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento
HSA	Albúmina de suero humano
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight
MOI	Multiplicidad de infección
NIH	Instituto Nacional de Salud
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
ORAC	Oxygen Radical Antioxidant Capacity
PDEA	Piridinilditioetanamina
PRM	Pradimicina

RU	Unidades de resonancia
SPR	Resonancia de Plasmón de Superficie
TFA	Ácido trifluoroacético
TREN	Tris(2-aminoetil)amina
Trp	Triptófano

ÍNDICE

ABSTRACT	i
ABREVIATURAS	ix
ÍNDICE	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Entrada/fusión del Virus	8
La glicoproteína gp120 como diana terapéutica	10
Los carbohidratos de la glicoproteína gp120 como diana terapéutica	12
Lectinas, inhibidores del proceso de entrada	14
Multivalencia e importancia de las interacciones CH- π	17
El problema del reconocimiento de carbohidratos	19
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS GENERALES	21
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	24
CAPÍTULO 1: Polifenoles derivados de trietilbenceno	31
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	33
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
Síntesis de los derivados fenólicos	36
Evaluación de los compuestos frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2	45
Estudios de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)	48
Determinación de la capacidad antioxidante	57
CONCLUSIONES	66
PARTE EXPERIMENTAL	67
BIBLIOGRAFÍA	92
CAPÍTULO 2: Dendrímeros de triptófano: síntesis y evaluación frente a VIH-1 y VIH-2	99
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	101
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	104
Síntesis de los compuestos de la Serie I	104
Síntesis de los compuestos de la Serie II	109
Evaluación de los compuestos frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2	122
Estudios de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)	126

Estudios de tiempo de adición	136
CONCLUSIONES	138
PARTE EXPERIMENTAL	140
BIBLIOGRAFÍA	171
CAPÍTULO 3: Dendrimeros de triptófano: evaluación frente a Enterovirus 71	175
INTRODUCCIÓN ENTEROVIRUS 71	177
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	184
Evaluación de los compuestos frente a la replicación de EV71	184
Selección de cepas virales resistentes	189
CONCLUSIONES	192
BIBLIOGRAFÍA	194
CONCLUSIONES GENERALES	197
MÉTODOS GENERALES	203
Métodos generales de síntesis y caracterización	205
Ensayos biológicos en cultivo	206
Resonancia de Plasmón Superficial	208
Ensayos de oxidación. Métodos FRAP, ABTS Y ORAC	208
BIBLIOGRAFÍA	211

Introducción General

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es el estadio clínico más avanzado de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Dicha infección provoca la destrucción progresiva del sistema inmune del cuerpo, y más en concreto de una subpoblación de linfocitos T, los CD4⁺. Como consecuencia se produce la infección por gérmenes oportunistas, el desarrollo de tumores y la afectación neurológica que definen el SIDA.

De acuerdo con los datos publicados en 2012 por el programa de las Naciones Unidas (ONUSIDA),¹ el número de personas infectadas por VIH se estimaba en alrededor de 35.3 millones. Durante ese año se produjeron 2.3 millones de nuevas infecciones y alrededor de 1.6 millones de fallecimientos, haciendo del SIDA la cuarta causa de mortalidad a nivel mundial.

El VIH, agente etiológico de la enfermedad, es un retrovirus que se transmite principalmente por vía sexual, y sanguínea así como por vía vertical (de madre a hijo).

El descubrimiento del SIDA ha estado acompañado de una gran polémica desde la detección de los primeros casos. Así, en 1983, el grupo de Luc Montagnier y Françoise Barré-Sinoussi, del Instituto Pasteur de Paris,² y el grupo liderado por Robert Gallo, en el NIH (Instituto Nacional de Salud) de Bethesda en EEUU, se disputaban el mérito del hallazgo de la enfermedad. Por una parte, Montagnier y Barré-Sinoussi habían detectado rastros de actividad bioquímica de un retrovirus a través del examen del ganglio de un paciente que tenía SIDA. Estos investigadores le enviaron una muestra a Robert Gallo, que había sido el primero en describir los retrovirus humanos. Tras analizar dicha muestra se adjudicó el descubrimiento hasta que en 1993 los tribunales fallaron a favor de Montagnier y Barré-Sinoussi.

En la actualidad se considera que los descubridores de VIH fueron Montagnier y Barré-Sinoussi y así se reconoció con la concesión del premio Nobel de medicina en 2008 a los dos investigadores franceses.³ Hay que destacar que la metodología en la que había estado trabajando el grupo de Gallo en los años previos para la identificación de los retrovirus humanos fue determinante para identificar esta enfermedad.

Hasta el momento se han aislado dos subtipos del VIH capaces de producir SIDA y que se han denominado VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 se encuentra diseminado por todos los continentes y es considerado el responsable de la epidemia mundial mientras que el VIH-2 es un virus

endémico del África Oriental y es menos virulento e infectivo que el VIH-1. Ambos virus difieren en su secuencia genómica, propiedades antigénicas y tamaño de sus proteínas.⁴

El material genético del VIH está constituido por ARN que debe ser copiado en ADN bicatenario para integrarse en el núcleo celular. Este proceso de conversión del ARN en ADN es la característica que define a los retrovirus. Se trata del proceso inverso al de la transcripción habitual y es llevado a cabo por la enzima viral Transcriptasa Inversa (TI).

Estructuralmente el VIH se compone de una envoltura lipídica y una nucleocápsida en cuyo interior se localiza el material genético y las enzimas necesarias para el ciclo viral (Figura 1).

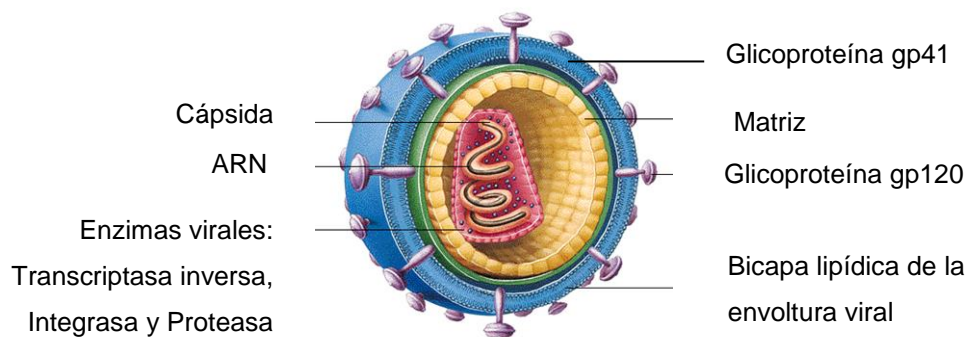


Figura 1. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

La envoltura consiste en una bicapa lipídica procedente de la célula infectada que contiene varias proteínas virales: la gp120 que sobresale hacia el exterior permaneciendo anclada en la membrana mediante otra proteína, la gp41. Estas dos glicoproteínas son las responsables de la interacción y fusión del virus con la célula huésped. La nucleocápsida está formada por la proteína p24 y envuelve dos cadenas idénticas de ARN y las enzimas necesarias para la integración en el genoma del huésped: transcriptasa inversa (TI), proteasa e integrasa.

Existen dos tipos de células humanas que son blanco principal de la infección por VIH, los linfocitos T y los macrófagos. La entrada del VIH en la célula se produce por la interacción del virus con un receptor específico situado en la superficie celular denominado CD4 (proteína de transmembrana constituida por 433 aminoácidos) (Figura 2). Esta molécula se expresa fundamentalmente en un subtipo de linfocitos T, los T colaboradores (helper). Posteriormente la proteína gp120 interacciona con los co-receptores de quimiocinas CXCR4 o CCR5 permitiendo

que la proteína viral gp41 se introduzca en la membrana celular favoreciendo así el proceso de fusión y la entrada del virus en la célula. A continuación, el virus se descapsida y se libera el genoma viral (en forma de ARN), el cual es convertido en ADN de doble cadena por la enzima viral Transcriptasa Inversa (TI). Este ADN vírico penetra en el núcleo de la célula y se integra en el ADN celular en un proceso catalizado por la enzima viral integrasa. De este modo, la célula queda “programada” para crear nuevas copias del VIH. Los mecanismos celulares normales transcriben el ADN viral integrado en el material genético de la célula huésped, en nuevas moléculas de ARN vírico y ARN mensajero vírico, que a su vez dirige la síntesis de nuevas proteínas víricas. Dichas proteínas virales una vez sintetizadas deben procesarse antes de ensamblarse en una partícula viral madura. Este proceso consiste en una ruptura proteolítica catalizada por la proteasa viral. Estas nuevas proteínas y el ARN vírico se organizan en un nuevo virión que abandona el linfocito T, tomando un fragmento de membrana para utilizarlo como envuelta (Figura 2).

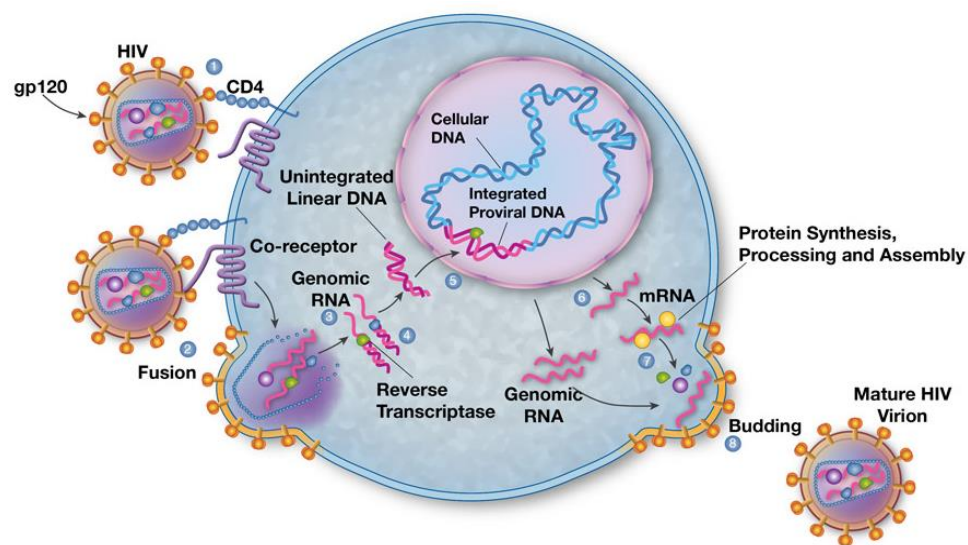


Figura 2. Ciclo replicativo del VIH

En la actualidad existen 24 medicamentos y varias combinaciones de éstos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento del SIDA. Dichos compuestos pueden clasificarse en cinco grandes grupos (Tabla 1):

1. Inhibidores del proceso de entrada/fusión.
2. Nucleósidos/Nucleótidos inhibidores de la enzima viral transcriptasa inversa (TI).
3. Inhibidores alostéricos de la TI.
4. Inhibidores de la enzima viral proteasa.
5. Inhibidores de la enzima viral integrasa.

Estos fármacos se prescriben en combinación, en lo que se ha denominado Terapia Antirretroviral de Gran Eficacia (TARGA, HAART en inglés). Esta terapia ha ido evolucionando a lo largo de los años desde un régimen de más de 20 píldoras al día, a una única píldora diaria conocida comercialmente como Atripla®, una combinación de emtricitabina, tenofovir y efavirenz. También existen otras formulaciones triples como Truvada®, así como distintas combinaciones de fármacos en función de la evolución de la enfermedad.⁶

Tabla 1. Fármacos anti-VIH aprobados para el tratamiento del SIDA hasta 2014

Familia farmacológica		Fármacos	
Inhibidores de Transcriptasa Inversa	Nucleósidos	Zidovudina (AZT) Didanosina (ddI) Lamivudina (3TC)	Estavudina (d4T) Abacavir (ABC) Emtricitabina (FTC)
	Nucleótidos	Tenofovir (TNV)	
	Alostéricos	Nevirapina (NVP) Delavirdina (DLV) Efavirenz (EFV) Etravirina Rilpivirina	
Inhibidores de Proteasa		Saquinavir (SQV) Indinavir (IDV) Ritonavir (RTV) Nelfinavir (NFV)	Atazanavir (AZV) Tipranavir (TPV) Fosamprenavir Darunavir
Inhibidores de Integrasa		Raltegravir Dolutegravir	
Inhibidores de entrada / fusión		Enfuvirtide (ENV; T-20) Maraviroc	

Gracias a este tipo de terapias, en los países desarrollados, se ha conseguido disminuir drásticamente la mortalidad de los pacientes y hacer desaparecer por un tiempo prolongado la carga viral en el plasma, aunque no se ha conseguido erradicar el virus. Sin embargo ya han aparecido virus resistentes a la mayoría de los agentes retrovirales de los que se dispone, lo que lleva a una menor efectividad de los mismos. Estos virus resistentes pueden ser transmitidos a otros individuos haciendo más complejo su tratamiento.⁷

Además, la toxicidad asociada a todos estos fármacos conduce a graves problemas secundarios como lipodistrofia, intolerancia a la glucosa, altos niveles de colesterol y problemas cardiovasculares, entre otros. Por todo ello, existe la urgente necesidad de descubrir nuevos fármacos con menos efectos secundarios, y que actúen bien frente a nuevas dianas virales o frente a las ya disponibles pero mediante mecanismos diferentes. Al igual que existe la necesidad de seguir investigando en vacunas para prevenir la enfermedad.

Aunque en los países desarrollados las terapias combinadas han conseguido transformar el SIDA en una enfermedad crónica, la situación es muy diferente en los países subdesarrollados donde el acceso al arsenal de fármacos antirretrovirales se ve limitado, unas veces por su alto coste, y otras por las trabas burocráticas que hacen que los tratamientos se demoren más de un año. Por ello, la solución en estos países sería encontrar un método de prevención barato y asequible económicamente como son los geles o cremas microbicidas, que persiguen inactivar al virus en el lumen vaginal antes de que pueda entrar en contacto con los linfocitos T4. De este modo, los geles microbicidas podrían ser aplicados tópicamente por las mujeres, con anterioridad al contacto sexual, para prevenir la infección por VIH.

Los primeros microbicidas (PRO2000, BufferGel, etc) llevaban en su composición un inhibidor de la entrada viral, no obstante, los ensayos realizados mostraron que la presencia de este tipo de inhibidor no es suficiente para prevenir la infección.⁸ Por ello, en la actualidad se están buscando microbicidas que impidan la entrada del virus en la célula huésped, y además inhiban la infección en el caso de que el virus consiga penetrar en la célula. En este sentido, en el Centro para el Programa de Investigación del Sida en Sudáfrica (CAPRISA, en sus siglas en inglés), nacido con el fin de promover la prevención y la investigación en VIH, se está trabajando con un microbicida que posee entre uno de sus componentes tenofovir, un inhibidor de la Transcriptasa Inversa.⁹

Otro microbicida en estudio, desarrollado por el grupo de investigación español BIOINDEN, posee como principio activo un dendrímero capaz de bloquear la infección por VIH de células epiteliales y del sistema inmune. Tras completar con éxito los ensayos “in vitro” y las pruebas de tolerancia y toxicidad en ratonas y conejas, se ha demostrado que dicho microbicida no es tóxico y ofrece protección frente al VIH durante 18 - 24 horas.¹⁰

Dado el interés que existe en la actualidad en la inhibición del proceso de entrada/fusión, en la presente memoria nos hemos centrado en dicho proceso como diana terapéutica para conseguir fármacos anti-VIH eficaces. Prueba del interés que reside en la inhibición de esta etapa es la aprobación de enfuvirtide y maraviroc,¹¹ dos inhibidores del proceso de entrada/fusión incorporados en 2003 y 2007 respectivamente al arsenal terapéutico para el tratamiento del SIDA. A continuación comentaremos las características más importantes de dicho proceso.

Entrada/fusión del VIH: una diana prometedora en el tratamiento anti-VIH

Bloquear la entrada del virus en la célula e impedir así la infección es una de las estrategias más atractivas para inhibir la replicación del VIH. Sin embargo, la complejidad del proceso como se ilustra a continuación, explica por qué los éxitos en este área han sido menores que los alcanzados frente a las enzimas virales (transcriptasa, integrasa y proteasa).

Una de las fases del proceso de infección comienza en las mucosas externas, donde se expresan las células dendríticas intersticiales. Los carbohidratos presentes en la superficie de la glicoproteína viral gp120 son reconocidos a través de la proteína DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-Grabbing Nonintegrin) presente en las células dendríticas y macrófagos (Figura 3).¹² DC-SIGN ayuda a la internalización del VIH en los órganos linfoides y a su presentación a las células T CD4⁺.¹³

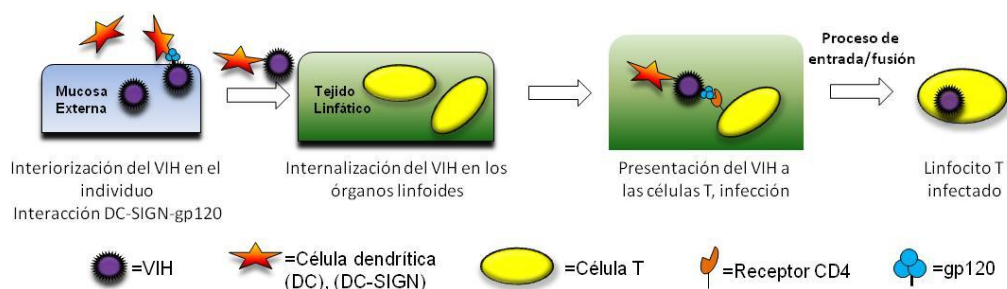


Figura 3. Proceso de llegada del VIH a los linfocitos T

A continuación tiene lugar la entrada del virus en la célula-T mediante un proceso complejo que puede dividirse en tres etapas (Figura 4): a) reconocimiento, b) unión a los co-receptores celulares, y c) fusión.

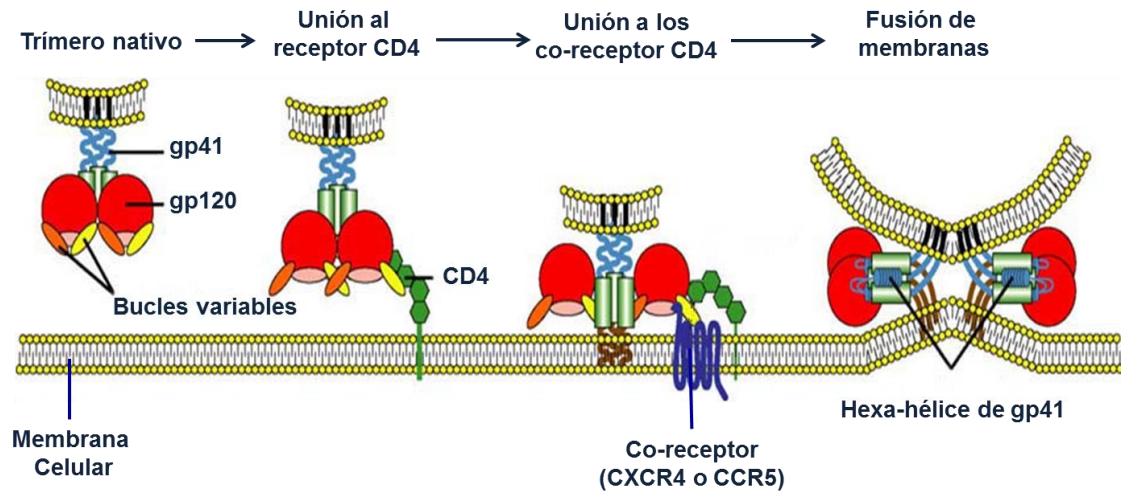


Figura 4. Proceso de entrada/fusión

En la etapa de reconocimiento tiene lugar la interacción de la glicoproteína viral gp120 y el receptor CD4 celular. Tras la interacción con el receptor CD4, la glicoproteína gp120 experimenta una serie de cambios conformacionales quedando expuestas las regiones variables V1, V2 y V3, siendo la región V3 la que está especialmente implicada en la posterior interacción con los correceptores celulares CCR5 y CXCR4. Esta región V3 de 35 residuos de longitud es muy variable, se encuentra altamente glicosilada y su secuencia de aminoácidos determina la unión del virus a los correceptores CCR5 o a los correceptores CXCR4. La unión de gp120 a los correceptores provoca cambios conformacionales en el complejo glicoprotéico gp120/gp41 que dejan expuesto el dominio hidrófobo de fusión de gp41 el cual se inserta en la membrana celular permitiendo la creación de poros en ella (fusión) y posibilitando la entrada del contenido viral en el citoplasma.

Los inhibidores del proceso de entrada/fusión se clasifican en función de la diana terapéutica hacia la que van dirigidos.¹⁴ Entre dichos inhibidores se encuentran:

1. Inhibidores de la unión virus-DC-SIGN
2. Inhibidores de la unión virus-célula T
 - a. Inhibidores de uniones inespecíficas
 - b. Inhibidores de la unión gp120-CD4
 - c. Reguladores de la expresión del receptor celular CD4
3. Inhibidores de la unión a los co-receptores celulares

- a. Inhibidores de CCR5
 - b. Inhibidores de CXCR4
4. Inhibidores de la fusión (Inhibidores de la glicoproteína viral gp41)

Dentro del grupo de los inhibidores del proceso de entrada/fusión el primer fármaco aprobado por la FDA fue el enfuvirtide (Fuzeón[®], ENV, T-20), un péptido de 30 aminoácidos capaz de interactuar con la glicoproteína viral gp41 bloqueando el proceso de fusión de las membranas viral y celular. Sin embargo, su naturaleza peptídica y su inestabilidad no permiten su administración por vía oral y debe ser inyectado dos veces al día, lo que limita su aplicación.¹⁵ El segundo fármaco aprobado fue el maraviroc (Pfizer), que actúa bloqueando el co-receptor celular CCR5, impidiendo así la unión con el complejo gp120-CD4.¹⁶ La mayor ventaja de este tipo de compuestos respecto al resto de medicamentos antirretrovirales es que actúan fuera de los linfocitos T, antes de que el VIH entre en la célula.

Además del complejo proceso de reconocimiento entre el VIH y la célula T anteriormente comentado, se producen otros procesos menos específicos de adsorción y unión entre el VIH y la membrana celular. Dichos procesos tienen lugar a través de interacciones iónicas (carga-carga) entre regiones de la gp120 que poseen múltiples aminoácidos de carácter básico (cargadas positivamente) y regiones polianiónicas (cargadas negativamente) de la célula huésped. Por tanto, no resulta sorprendente el hecho de que existan un gran número de polisacáridos de naturaleza aniónica de origen natural y sintético que muestran actividad anti-VIH al interactuar con las regiones básicas de la gp120 impidiendo su interacción con las células CD4. Entre ellos se encuentran polianiones solubles como el sulfato de dextrano, la sulfato ciclodextrina o la heparina.¹⁷ Otro grupo de compuestos con uniones inespecíficas lo constituyen los sulfonatos poliméricos de naftaleno que actúan uniéndose de manera no específica a las células dendríticas.¹⁸

La glicoproteína gp120 como diana terapéutica

Tal y como se ha comentado, la envoltura del VIH consiste en una bicapa lipídica que contiene varias glicoproteínas virales: la gp120 que sobresale hacia el exterior permaneciendo anclada en la membrana mediante otra proteína, la gp41 (Figura 5).

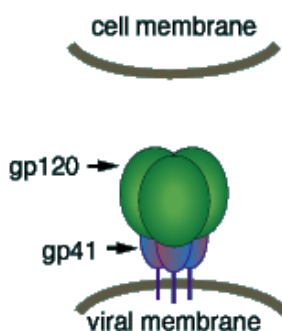


Figura 5. Complejo gp120-gp41

La gp120 ocupa un lugar preferente en la infección por VIH por ser el primer punto de contacto con la célula huésped. Debido a ello, en la actualidad se están realizando muchos esfuerzos para desarrollar compuestos que interaccionen específicamente con dicha glicoproteína impidiendo así la interacción con el receptor celular.

Existen diferentes aproximaciones para tratar de inhibir dicha interacción. Entre ellas, destacaremos en primer lugar la desarrollada por la compañía farmacéutica Bristol Meyers Squib que mediante cribado de alto rendimiento descubrió el compuesto BMS-488043 (Figura 6). Dicho compuesto demostró actividad antirretroviral en pacientes infectados con VIH tras administración oral pero su desarrollo fue abandonado debido a su pobre farmacocinética.¹⁹

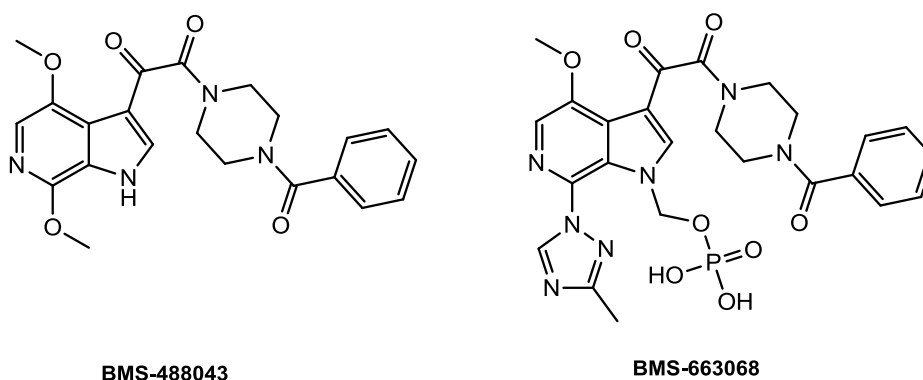


Figura 6. Estructura de los compuestos BMS que evitan la interacción entre gp120 y el receptor celular CD4

A partir de BMS-488043 y tras un estudio de relaciones estructura-actividad se llegó al compuesto BMS-663068 (Figura 6) que se encuentra en la actualidad en fase clínica II.²⁰ BMS-488043 y BMS-663068 representan las primeras moléculas pequeñas capaces de interferir de forma selectiva en la interacción entre la gp120 situada en la superficie viral y el receptor celular de la célula huésped CD4.

También la compañía Pfizer Global Research inició en 2009 una línea de investigación centrada en la glicoproteína gp120 dentro de la cual encontró una nueva familia de inhibidores de entrada cuyo prototipo es el compuesto representado en la Figura 7. Este compuesto y los derivados resultantes de las modificaciones en el fragmento de metoxipiridina actúan inhibiendo la primera etapa del proceso de entrada ya que se unen directamente a la superficie de la glicoproteína viral gp120 evitando que ésta pueda interaccionar con el receptor celular CD4 de la célula huésped.

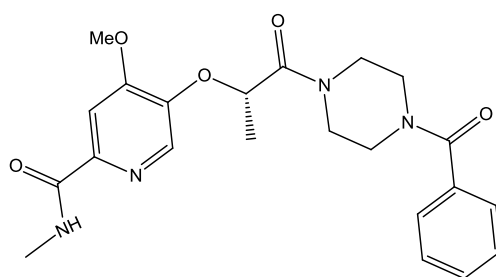


Figura 7. Estructura del compuesto desarrollado por la compañía Pfizer

En la presente Tesis doctoral nos hemos centrado en la glicoproteína viral gp120, y más concretamente en los carbohidratos presentes en ella, para el desarrollo de compuestos con actividad frente al VIH. Esta aproximación es bastante novedosa ya que, únicamente, existe un ejemplo en la literatura de un polímero funcionalizado con benzoboroxoles que posee una elevada afinidad por los carbohidratos de gp120. Actualmente dicho compuesto está en fase de estudio como microbicida.²¹

Los carbohidratos de la glicoproteína gp120 como diana terapéutica

La glicoproteína viral gp120 está densamente glicosilada, aproximadamente el 50% de los 120 kDa de su peso molecular se debe a la presencia de carbohidratos. Es importante señalar que los carbohidratos de la cubierta viral son sintetizados por el huésped ya que el VIH no posee la maquinaria capaz de producir sus propios carbohidratos.²² La presencia de carbohidratos en la superficie viral afecta a numerosos eventos que tienen lugar durante el ciclo replicativo del VIH, entre ellos la interacción con el receptor celular CD4.²³ Estos oligosacáridos siempre se unen a la proteína a través de residuos de Asparagina (N-glicosidación) no observándose en ningún caso O-glicosidación.²⁴

Las 24 posibles posiciones de N-glicosilación están ocupadas por oligosacáridos en los que está presente una estructura común del pentasacárido A (Figura 8). Dicho pentasacárido posee dos residuos de N-acetilglucosamina (en azul) unidos por un extremo al grupo amida de un residuo de asparagina de la proteína y por otro a tres manosas (en rojo). A esta estructura básica pueden estar unidos distintos tipos de azúcares para dar lugar a tres tipos de oligosacáridos: a) alto contenido en manosa (high mannose), b) complejo y c) híbrido.

Los oligosacáridos de alto contenido en manosa, tienen hasta otros 6 residuos de manosa unidos a las distintas ramas de la estructura básica tal y como se observa en la Figura 8. En las estructuras complejas podemos encontrar otros azúcares diferentes de manosa, entre ellos: galactosa, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina y L-fucosa. En las estructuras híbridas se encuentran elementos estructurales comunes a los dos tipos de oligosacáridos anteriores.

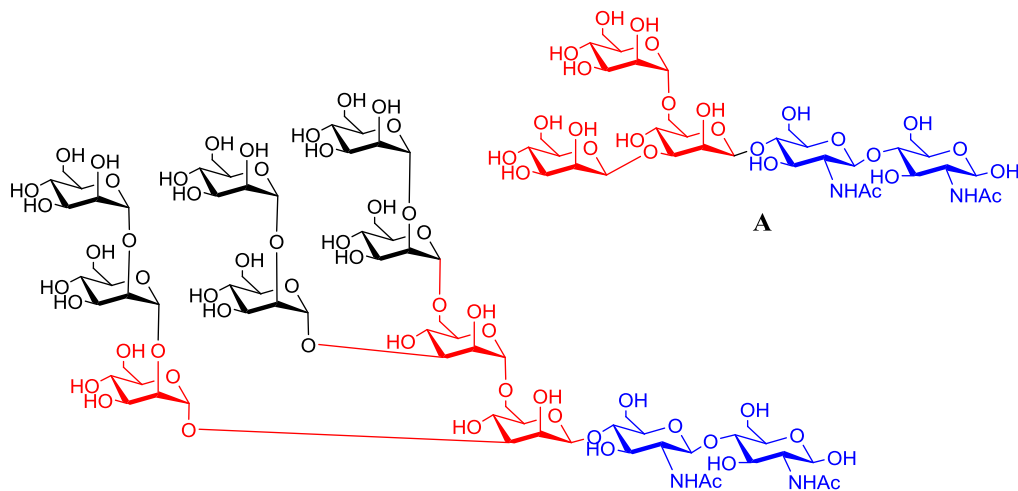


Figura 8. Estructura química del fragmento básico de pentasacárido A y un oligosacárido con alto contenido en manosa.

Los azúcares de la glicoproteína gp120 actúan como “escudo protector” enmascarando los epítopos inmunogénicos (dianas para el ataque de los anticuerpos) lo que permite al virus burlar la respuesta inmune de los organismos a los que infecta.²⁵

Lectinas, inhibidores del proceso de entrada

En la naturaleza existe un gran número de proteínas que interaccionan con carbohidratos de forma no covalente. Ejemplos significativos de este tipo de proteínas son las enzimas específicas de carbohidratos (glicosiltransferasas, glicosidasas, etc.)²⁶ y los anticuerpos anticarbohidrato.²⁷ Un tercer grupo de proteínas que se comporta de este modo son las lectinas.

Las lectinas se encuentran en la mayoría de los seres vivos, desde virus o bacterias hasta plantas y animales. Tienen la capacidad de unirse a mono- y oligosacáridos de forma reversible y con gran especificidad pero ni poseen actividad catalítica ni son producto de la respuesta inmune. Cada molécula de lectina posee dos o más sitios de reconocimiento de carbohidratos. Por tanto, cuando las lectinas interaccionan con los carbohidratos de una determinada célula, por ejemplo un eritrocito, no solo se combinan con los azúcares presentes en su membrana celular sino que además causan entrecruzamiento (cross-linking) entre los carbohidratos presentes en otras membranas celulares lo que provoca la precipitación de las células. Este fenómeno conocido como aglutinación es una de las características más importantes de las lectinas, dándose también para polisacáridos y para glicoproteínas, empleándose de manera rutinaria para su detección y caracterización.²⁸

Algunas lectinas, y más concretamente las que poseen especificidad por manosa o *N*-acetilglucosamina como concavalina A y cianovirina, poseen actividad antiviral y en particular actividad frente al VIH.²⁹ Dicha acción antiviral se debe a su unión a los azúcares (manosa, *N*-acetilglucosamina, galactosa y fucosa) de la glicoproteína gp120. Aunque el mecanismo exacto no se conoce todavía, parece probable que la unión de dichas lectinas a los oligosacáridos de gp120 afecte a la movilidad de éstos, impidiendo de algún modo los cambios conformacionales que son necesarios para que la glicoproteína gp120 interaccione con los co-receptores celulares y el virus pueda entrar en la célula a la que pretende infectar.

Una observación muy interesante es que, ante la presión de determinadas lectinas, el VIH desarrolla mutaciones cuyo resultado es la eliminación/modificación de los sitios de *N*-glicosilación situados en la glicoproteína gp120 pero no en los de la glicoproteína gp41.³⁰ En este caso, la aparición de cepas virales mutadas, contrariamente a lo que ocurre en las terapias antivirales convencionales, lejos de suponer un hecho perjudicial podría suponer un

beneficio, ya que los epítomos inmunogénicos del virus quedan expuestos.³¹ De este modo, el sistema inmunitario del huésped podría reconocerlos y atacar al virus.³² Las cepas virales resistentes que aparecen bajo la presión de las lectinas son, además, sensibles a la acción de otros fármacos que inhiben el proceso de entrada del VIH. Las lectinas ensayadas hasta el momento no han mostrado toxicidad significativa. Esta falta de toxicidad podría ser quizá debida a una interacción preferente con las manosas de la cubierta viral.

La especificidad de determinadas lectinas por el VIH parece residir en la inusual densidad de azúcares de la glicoproteína gp120 y en la capacidad de dichas lectinas para interaccionar con residuos terminales de manosa que no son habituales en las células de mamíferos.³³

En la Figura 9A se representan todos los puntos de glicosidación, 24 en total, en la glicoproteína gp120. En 9B se representan en un tono más claro los sitios en los que desaparece la glicosidación después de someter al virus a la presión de diferentes tipos de lectinas (GNA, *Galanthus nivalis* agglutinin, HHA, *Hippeastrum hybrid* agglutinin y cianovirina).

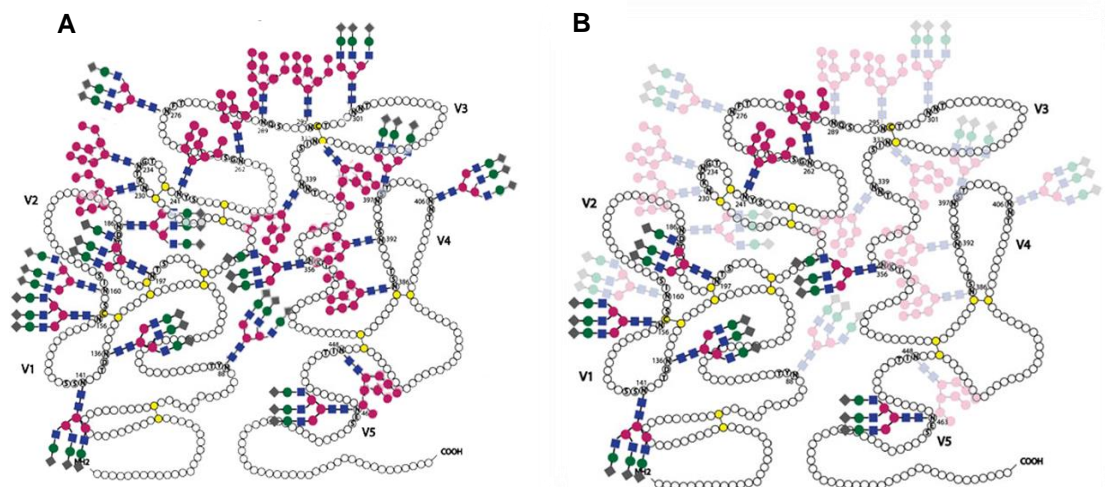


Figura 9. Sitios de glicosidación de gp120

Por tanto las lectinas, y por extensión aquellos compuestos que interaccionen con la glicoproteína gp120 simulando la acción de las lectinas, podrían actuar sobre la replicación viral por un mecanismo dual: en primer lugar, y mediante una acción directa, impidiendo los procesos de entrada y fusión del virus, y en segundo lugar, mediante un mecanismo indirecto, favoreciendo la aparición de cepas de virus resistentes que han perdido los sitios de N-glicosidación y poseen los epítomos inmunogénicos expuestos. Este hecho podría favorecer su reconocimiento por el sistema inmune del huésped.³²

Debido a su naturaleza proteica las lectinas naturales no presentan las propiedades farmacocinéticas adecuadas para su posible consideración como fármacos y es por ello por lo que resultaría deseable disponer de moléculas sintéticas diferentes a las lectinas capaces de actuar mediante un mecanismo similar al de las lectinas naturales. Además, muchas lectinas poseen propiedades mitogénicas, aglutinantes de glóbulos rojos y algunas de ellas pueden originar procesos inflamatorios, toxicidad celular y desencadenar una respuesta inmunitaria, lo que comprometería su eventual eficacia antiviral. Las lectinas son también relativamente costosas de producir y purificar a gran escala, pudiendo presentar problemas de estabilidad y almacenaje.³⁴

Por todo ello se está investigando activamente en compuestos no proteicos de menor peso molecular con capacidad para el reconocimiento de carbohidratos. Hace más de una década, se descubrió que la pradimicina A (Figura 10), un antibiótico antifúngico no peptídico y estructura compleja producido por el actinomiceto *Actinomadura hibisca*, era capaz de inhibir la replicación del VIH mediante un mecanismo de acción similar al de las lectinas naturales. Se ha sugerido que la actividad anti-VIH mostrada por dicho compuesto podría ser debida a la unión con el disacárido terminal de α -(1-2)-manosa muy abundante en los oligosacáridos presentes en la cubierta del VIH. Por tanto, la pradimicina A constituye la primera molécula pequeña de naturaleza no peptídica capaz de actuar de este modo y desde este punto de vista se puede considerar como una nueva clase de “lectina artificial” que posee actividad anti-VIH y que fuerza al virus a seguir un patrón único de mutación que tiene como resultado alteraciones en la glicoproteína gp120 de la cubierta viral.³⁴

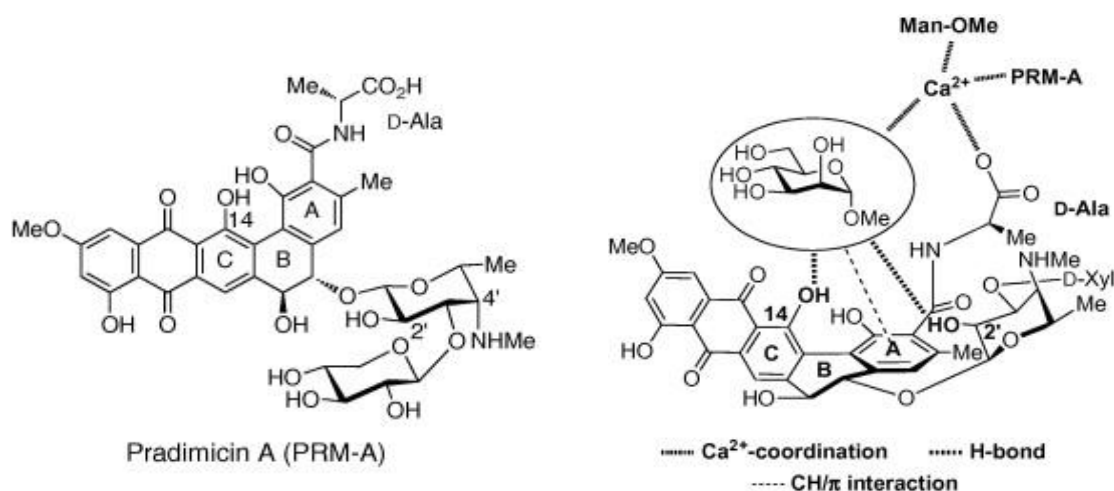


Figura 10. Estructura de pradimicina A. Modelo de unión entre PRM-A y Manosa-OMe

La unión de la pradimicina A a manosa es dependiente de Ca^{2+} dando lugar a complejos formados por dos moléculas de pradimicina, cuatro de manosa y un átomo de calcio.³⁵ Su bajo peso molecular, 838 Da, (frente a los ~ 8.5 a 50 KDa de las lectinas) y su naturaleza no peptídica constituyen ventajas a la hora de su desarrollo como fármaco. De este modo, la pradimicina A es un compuesto que avala la posibilidad de que otras moléculas más pequeñas que las lectinas son capaces de interaccionar con los oligosacáridos de gp120 e inhibir la replicación del VIH.

Otro ejemplo notable de compuesto no peptídico lo constituye el “Alcian Blue”, una ftalocianina catiónica (Figura 11). El “Alcian Blue” se emplea tradicionalmente para cuantificar glucosaminoglicanos por su capacidad para formar complejos con carbohidratos, y su actividad anti-VIH había sido descrita por Vzorov.³⁶ Estudios sobre el mecanismo de acción realizados en 2009,³⁷ mostraron que este compuesto no sólo inhibía la infección por VIH de células sanas, sino que prevenía la formación de sincitios y la captura de partículas virales por DC-SIGN. Todo ello, junto con la capacidad de producir pérdidas de sitios de *N*-glicosilación en gp120 tras una exposición prolongada del virus a esta ftalocianina, proporcionaba evidencias de que este compuesto bloqueaba la infección viral mediante la interacción con los glicanos de las glicoproteínas presentes en la envoltura viral.

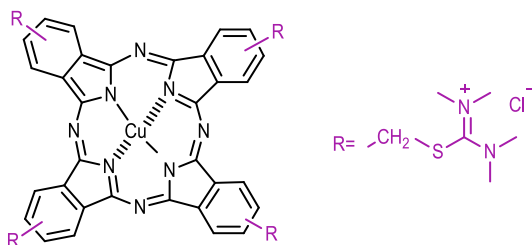


Figura 11. Estructura molecular del Alcian Blue

De esta forma se pone de manifiesto que es posible encontrar compuestos que presenten actividad anti-VIH y se comporten de forma análoga a las lectinas.

Multivalencia e importancia de las interacciones CH- π

Las interacciones lectina-monosacárido son generalmente débiles y de baja afinidad, con constantes de afinidad en el rango milimolar. Además muestran una especificidad no demasiado alta si se compara con la estricta especificidad que poseen las interacciones

enzima-sustrato. La razón de la baja afinidad es que el sitio de reconocimiento de carbohidratos de las lectinas es un bolsillo poco profundo muy expuesto al disolvente.^{38,39} Sin embargo, las lectinas muestran alta afinidad y una exquisita especificidad por los oligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos presentes en la superficie celular, un requisito ineludible para la función (reconocimiento molecular) que desempeñan a nivel biológico. El mecanismo empleado por las lectinas para aumentar la afinidad y especificidad en el reconocimiento consiste en establecer múltiples interacciones con el oligosacárido con el que interaccionan (teoría de multivalencia).⁴⁰ Este tipo de asociación polivalente, empleado por los sistemas biológicos para el reconocimiento molecular, implica muchas interacciones poco intensas en lugar de una única interacción de gran intensidad.

Por otra parte, y gracias a la resolución de las estructuras cristalinas de los complejos lectina-carbohidrato se han podido topografiar en detalle los sitios de reconocimiento de carbohidratos de numerosas lectinas.⁴¹ De este modo, se ha determinado que las interacciones lectina-carbohidrato son de tipo no covalente y se establecen fundamentalmente a través de enlaces de hidrógeno (bidentado o cooperativo), fuerzas de van der Waals, interacciones CH- π y/o coordinación con metales.³⁹ Además, es relativamente frecuente encontrar aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) en el sitio de reconocimiento de carbohidratos.⁴²

Estos estudios han puesto de manifiesto que en estos casos se establecen interacciones clave entre la región hidrófoba del azúcar (hidrógenos unidos al anillo de piranosa) y los anillos aromáticos de las cadenas laterales de los aminoácidos situados en su proximidad.

Por otra parte, estudios teóricos recientes han demostrado la existencia de interacciones estabilizadoras entre la fucosa (tomada como modelo de galactosa) y el benceno (Figura 12). En el mismo trabajo los autores han demostrado experimentalmente la existencia de interacciones CH/ π entre el benceno (o fenol) y los átomos de hidrógeno de la cara α del metil- β -galactósido.⁴³ Un aspecto a destacar es que para que tenga lugar la interacción no se requiere la rigidez que proporciona la estructura tridimensional de una proteína.

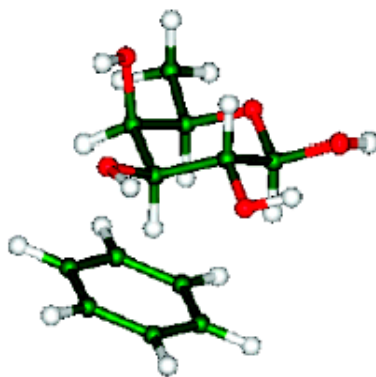


Figura 12. Modelo fucosa-benceno

El problema del reconocimiento de carbohidratos en agua

Tal y como veremos a continuación, el objetivo de esta Tesis Doctoral es la obtención de moléculas con potente actividad antiviral frente al VIH mediante un mecanismo similar al descrito para diferentes lectinas y para la pradimicina A. Para ello, dichas moléculas deben ser capaces de unirse a los carbohidratos de la glicoproteína gp120 presente en la cubierta del virus.

Para el diseño de estas moléculas además de las características de la interacción carbohidrato-lectina comentadas hasta el momento (multivalencia, interacciones no covalentes) hay dos aspectos básicos que hay que tener en cuenta. En primer lugar, la interacción debe tener lugar en el medio donde se encuentran los carbohidratos en la naturaleza: el agua, a la que se parecen enormemente debido al gran número de grupos hidroxilo presentes en ellos. En segundo lugar, nuestros compuestos deben ser capaces de discriminar entre los carbohidratos presentes en la cubierta del VIH (preferentemente manosa) y los que están presentes en la célula huésped.

En los últimos años se han descrito numerosos receptores sintéticos con distinta capacidad de reconocer carbohidratos.⁴⁴⁻⁴⁸ Entre ellos, los receptores tripodales basados en el esqueleto de 2,4,6-trietilbenceno ocupan un lugar destacado (Figura 13). Dichos sistemas adoptan una conformación termodinámicamente favorable en la que los seis sustituyentes del anillo aromático se disponen en forma alternada por encima y por debajo del anillo de benceno. Es decir, adoptan un patrón alternante de tipo *ababab* (del inglés “a”, *above*, “b”, *below*), y por tanto, muestran una segregación facial entre los sustituyentes 1,3,5 y los 2,4,6, mostrando simetría C_3 .⁴⁹ Dicha característica estereoquímica, totalmente excepcional, hace del anillo de

benceno persustituido una plataforma ideal para preparar receptores sintéticos tripodales. Dicho anillo ha sido empleado por numerosos grupos⁵⁰ como esqueleto central en la preparación de gran variedad de receptores con capacidad para unirse a diferentes monosacáridos e incluso a oligosacáridos cortos con afinidades y selectividades significativas.

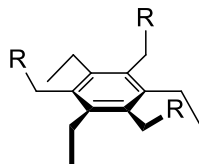


Figura 13. Esqueleto de 2,4,6-trietilbenceno sustituido en 1, 3 y 5 con disposición *ababab*

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS GENERALES

Como ya se ha mencionado en la introducción la interacción con los carbohidratos presentes en la glicoproteína gp120 podría constituir una aproximación terapéutica eficaz y novedosa para inhibir la replicación del VIH.⁵¹ Dicha aproximación es conceptualmente diferente a las aproximaciones terapéuticas existentes hasta el momento ya que si nuestra hipótesis es correcta se podría pensar en un efecto antiviral dual, que consistiría en una acción directa, por la que el compuesto inhibiría el proceso de fusión/entrada del virus en la célula huésped, y en otra indirecta, por la que se facilitaría la respuesta del sistema inmune del organismo al que infecta el virus.

Existen estudios *in vivo* que apoyan que esta aproximación terapéutica podría ser realista y viable. Así por ejemplo, Reitter y colaboradores demostraron que en monos infectados con una variante del Virus de la Inmunodeficiencia de Simios (VIS), que contiene dos mutaciones en el gen *env* que codifica para las glicoproteínas de la cubierta, tiene lugar un aumento en el nivel de anticuerpos y una caída considerable en la carga viral.⁵²

Esta aproximación podría ser efectiva además frente a otras enfermedades crónicas causadas por virus con cubierta tales como el virus de la hepatitis C, el virus Influenza, el virus Corona, etc., ya que se podría dar el caso de que un mismo compuesto presentase simultáneamente actividad frente a dos o más virus con cubierta.

En base a todo ello en el año 2006 nuestro grupo inició un proyecto de investigación cuyo objetivo era el diseño y síntesis de compuestos de fácil accesibilidad sintética capaces de unirse a los carbohidratos presentes en la cubierta de determinados virus, y de manera especial, en la del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Para el diseño de dichos compuestos se tuvo en cuenta el tipo de interacción que establecen las lectinas con los carbohidratos que son múltiples y de baja afinidad, en concreto enlaces de hidrógeno, interacciones CH- π , fuerzas de Van der Waals, etc.

Fruto del trabajo desarrollado en esta primera etapa fue la identificación de dos cabezas de serie, **AL-170**^{53,54} (Figura 1) y **AL-195**⁵⁵ (Figura 2), que constituyen el punto de partida de la presente Tesis Doctoral.

El compuesto **AL-170** posee un núcleo central o “scaffold” de trietilbenceno al que se le han unido tres anillos fenólicos con los OHs en posición 2,3,4. Dicho compuesto inhibe la

replicación del VIH-1 a nivel micromolar ($EC_{50} = 6.3 \pm 0.7 \mu M$; $CC_{50} = 184 \pm 14 \mu M$).⁵³ Además, estudios de RMN en DMSO indicaron que **AL-170** interacciona con oligosacáridos de manosa similares a los presentes en la cubierta del VIH.⁵⁴

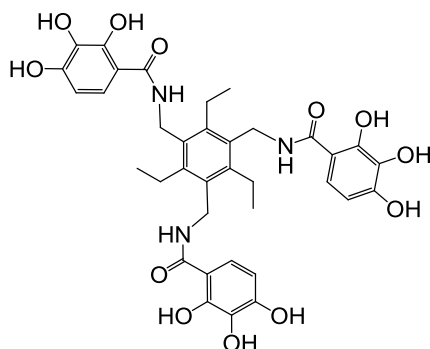


Figura 1. Estructura del compuesto AL-170

En el trabajo que se describe en el capítulo 1 de la presente memoria se pretende por un lado, estudiar si **AL-170** es capaz de interaccionar con los carbohidratos de la cubierta del VIH, y por otro encontrar compuestos más potentes y selectivos. Finalmente, debido a su estructura fenólica se pretende determinar las propiedades antioxidantes de **AL-170**.

El trabajo que se describe en el capítulo 2 tiene como punto de partida el compuesto **AL-195**⁵⁵ (Figura 2), cuya estructura consiste en un anillo central de trietilbenceno sustituido con tres anillos de 1,3,5-triazina y seis residuos de triptófano en la periferia.

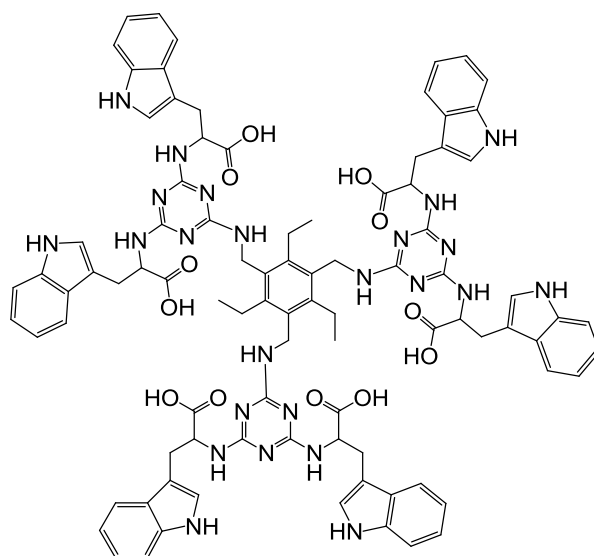


Figura 2. Estructura del compuesto AL-195

Dicho compuesto inhibe la replicación del VIH-1 a nivel micromolar ($EC_{50} = 16 \mu M$; $CC_{50} > 250 \mu M$). Además en experimentos SPR, se demostró que dicho compuesto se une a la

glicoproteína gp120 con una constante de afinidad ($K_D = 14 \mu\text{M}$). Los datos biológicos obtenidos, junto con los estudios de SPR, demuestran, por un lado la importancia del triptófano en la actividad biológica y por otro que la multivalencia, un aspecto importante en la interacción de las lectinas con los carbohidratos, desempeña un papel crucial tanto en la actividad como en la interacción con gp120.

En el trabajo descrito en el capítulo 2 se pretende, por un lado determinar si la presencia de los anillos de triazina son importantes para la actividad y por otro aumentar el número de triptófanos de la periferia para conseguir un mayor número de interacciones con los carbohidratos de gp120 y de este modo obtener compuestos más potentes y selectivos que el prototipo, **AL-195**.

Todos los compuestos descritos en ambos capítulos de la presente memoria fueron ensayados frente a VIH-1 y VIH-2 y otros virus con cubierta tales como herpes, influenza, corona, estomatitis vesicular, etc., por el equipo del Dr. Jan Balzarini de la Universidad Católica de Lovaina. Además, se ensayaron frente a otros virus con cubierta tales como hepatitis C, chikungunya, etc., por el equipo del Dr. Johan Neyts, también de la Universidad Católica de Lovaina. En estos ensayos se observó que los compuestos descritos en el capítulo 2 inhiben de manera significativa y selectiva la replicación de dos virus (EV71 y ECHO11) que pertenecen a la familia de los picornavirus. Ante lo inesperado de este resultado decidimos explorar más en detalle las características biológicas de dicha inhibición así como estudiar el mecanismo de acción de nuestros compuestos. Los resultados de dicho estudio se describen en el capítulo 3 de esta memoria.

BIBLIOGRAFÍA

1. AIDS epidemic update:2012, UNAIDS 2012.
2. (Barré-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vézinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W. and Montagnier, L. Isolation of a T lymphotropic Retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science* **1983**, 220 (4599), 868-871.
3. <http://nobelprize.org/>
4. a) Powell, K. L. and Darby, G. HIV reverse transcriptase as a target for antiviral drugs. *Desig of Anti-AIDS drugs*. Ed. De Clercq, E. Elsevier. Amsterdam. **1990**, 123-140; b) De Clercq, E. Antiviral agents and human viral diseases. *4th Ed.Lippincott Raven Publisher*. Philadelphia. **1997**, 1-14.
5. www.fda.gov
6. Flexner, C. HIV drug development: the next 25 years. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 959-966.
7. Yerly, S.; Kaiser, L.; Race, E.; Bru, J. P.; Clavel, F. and Perrin, L. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet* **1999**, 354 (9180), 729-733.
8. Balzarini, J. and Van Damme, L. Microbicide drug candidates to prevent HIV infection. *Lancet* **2007**, 369, 787-797.
9. Abdool Karim, Q.; Abdool Karim, S. S.; Frohlich, J. A.; Grobler, A. C.; Baxter, C. and Mansoor, L. E. Effectiveness and Safety of Tenofovir Gel, an Antiretroviral Microbicide, for the Prevention of HIV Infection in Women. *Science*, **2010**, 329, 1168 -1174.
10. Chonco, L.; Pion, M.; Vacas, E.; Rasines, B.; Maly, M.; Serramía, M. J.; López-Fernández, L.; De la Mata, J.; Álvarez, S.; Gómez, R. and Muñoz-Fernández, M.A. Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *J. Control Release*. **2012**, 161 (3), 949-958.
11. Opar, A. New HIV drug clases on the horizon. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, 6, 258-259.
12. Geijtenbeek, T.B.H.; Kwon, D.S.; Torensma, R.; van Vliet, S.J.; van Duijnhoven, G.C.F.; Middel, J.; Cornelissen, I.L.M.H.A.; Nottet, H.S.L.M.; KewalRamani, V.N.; Littman, D.R.;

- Figdor, C.G. and van Kooyk, Y. DC-SIGN, a Dendritic Cell-Specific HIV-1-Binding Protein that Enhances trans-Infection of T Cells. *Cell* **2000**, 100, 587-597.
13. (a) Kooyk, Y.v. and Geijtenbeek, T.B.H. DC-SIGN: Escape Mechanism For Pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3 (9), 697-709; b) Wu, L. and KewalRamani, V.N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 859-868.
 14. Qian, K.; Morris-Natschke, S. L. and Kuo-Hsiung, L. HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy. *Med. Res. Rev.* **2009**, 29 (2), 369-393.
 15. Matthews, T.; Salgo, M.; Greenberg, M.; Chung, J.; DeMasi, R. and Bolognesi, D. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CDA lymphocytes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3 (3), 215-225.
 16. Dorr, P.; Westby, M.; Dobbs, S.; Griffin, P.; Irvine, B.; Macartney, M.; Mori, J.; Rickett, G.; Smith-Burchnell, C.; Napier, C.; Webster, R.; Armour, D.; Price, D.; Stammen, B.; Wood, A. and Perros, M. Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49 (11), 4721-4732.
 17. a) Callahan, L.N.; Phelan, M.; Mallinson, M. and Norcross, M.A. Dextran Sulfate Blocks Antibody Binding to the Principal Neutralizing Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 without Interfering with gp120-CD4 Interactions. *J. Virol.* **1991**, 65 (3), 1543-1550; b) Mondor, I.; Ugolini, S. and Sattentau, Q.J. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Attachment to HeLa CD4 Cells Is CD4 Independent and gp120 Dependent and Requires Cell Surface Heparans. *J. Virol.* **1998**, 72 (5), 3623-3634; c) Moulard, M.; Lortat-Jacob, H.; Mondor, I.; Roca, G.; Wyatt, R.; Sodroski, J.; Zhao, L.; Olson, W.; Kwong, P.D. and Sattentau, Q.J. Selective interactions of polyanions with basic surfaces on human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **2000**, 74 (4), 1948-1960; d) McReynolds, K. and Gervay-Hague, J. Chemotherapeutic interventions targeting HIV interactions with host-associated carbohydrates. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (5), 1533-1552.
 18. Yahi, N.; Sabatier, J. M.; Nickel, P.; Mabrouk, K.; González-Scarano, F. and Fantini, J. Suramin inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to

- galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human colon epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 24349-24353.
19. Meanwell, N. A.; Wallace, O. B.; Fang, H.; Wang, H.; Deshpande, M.; Wang, T.; Yin, Z.; Zhang, Z.; Pearce, B. C.; James, J.; Yeung, K-S.; Qiu, Z.; Wright, J. J. K.; Yang, Z.; Zadajura, L.; Tweedie, D. L.; Yeola, S.; Zhao, F.; Ranadive, S.; Robinson, B. A.; Gong, Y-F.; Wang, H-G. H.; Blair, W. S.; Shi, P-Y.; Colonno, R. J. and Lin, P-F. Inhibitors of HIV-1 attachment. Part 2: An initial survey of indol substitution patterns. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1977-1981.
20. a) Regueiro-Ren, A.; Xue, Q. M.; Swiderski, J. J.; Gong, Y-F.; Mathew, M.; Parker, D. D.; Yang, Z.; Eggers, B.; D'Arienzo, C.; Sun, Y.; Malinowski, J.; Gao, Q.; Wu, D.; Langley, D. R.; Colonno, R. J.; Chien, C.; Grasela, D. M.; Zheng, M.; Lin, P-F.; Meanwell, N. A. and Kadow, J. F. Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV Attachment. 12. Structure-Activity Relationships Associated with 4-Fluoro-6-azaindole Derivatives Leading to the Identification of 1-(4-Benzoylpiperazin-1-yl)-2-(4-fluoro-7-[1,2,3]triazol-1-yl)-1H-pyrrolo[2,3-c]pyridine-3-yl)ethane-1,2-dione. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1656-1669;
b) Haqqani, A. A. and Tilton, J. C. Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research* **2013**, 98, 158-170.
21. Jay, J. I.; Lai, B. E.; Myszka, D. G.; Mahalingam, A.; Langheinrich, K.; Katz, D. F.; Kiser, P. F. Multivalent benzoboroxole functionalized polymers as gp120 glycan targeted microbicide entry inhibitors. *Mol. Pharmaceutics* **2010**, 7, 116-129.
22. Helenius, A. and Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **2001**, 291, 2364-2369.
23. Scanlan, C.N.; Offer, J.; Zitzmann, N. and Dwek, R.A. Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* **2007**, 446, 1038-1045.
24. Botos, I. and Wlodawer, A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, 88, 233-282.
25. Reitter, J. N.; Means, R. E. and Desroiers, R. C. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat. Med.* **1998**, 4 (6), 679-684.
26. Bojarova, P. and Kren, V. Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends Biotechnol.* **2009**, 27 (4), 199-209.

27. Weintraub, A. Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydr. Res.* **2003**, 338 (23), 2539-2547.
28. Lis, H. and Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674.
29. Balzarini, J.; Hatse, S.; Vermeire, K.; Princen, K.; Aquaro, S. and Perno, C. Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48 (10), 3858-3870.
30. Balzarini, J.; Laethem, K.V.; Hatse, S.; Froeyen, M.; Damme, E.V.; Bolmstedt, A.; Peumans, W.; de Clercq, E. and Schols, D. Marked Depletion of Glycosylation Sites in HIV-1 gp120 under Selection Pressure by the Mannose-Specific Plant Lectins of *Hippeastrum Hybrid* and *Galanthus nivalis*. *Mol. Pharmacol.* **2005**, 67, 1556-1565.
31. Balzarini, J.; Van Laethem, K.; Hatse, S.; Froeyen, M.; Peumans, W.; Van Damme, E. and Schols, D. Carbohydrate-binding Agents Cause Deletions of Highly Conserved Glycosylation Sites in HIV gp120: A New Therapeutic Concept to hit the Achilles Heel of HIV. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (49), 41005-41014.
32. Balzarini, J. Targeting the glycans of gp120: a novel approach aimed at the Achilles heel of HIV. *The Lancet* **2005**, 5, 726-731.
33. Balzarini, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Res.* **2006**, 71, 237-247.
34. Balzarini, J.; Van Laethem, K.; Daelemans, D.; Hatse, S.; Bugatti, A.; Rusnati, M.; Igarashi, Y.; Oki, T.; Schols, D. Pradimicin A, a carbohydrate-binding nonpeptidic lead compound for treatment of infections with viruses with highly glycosylated envelopes, such as human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **2007**, 81 (1), 362-373.
35. a) Ueki, T.; Oka, M.; Fukagawa, Y. and Oki, T. Studies on the mode of antifungal action of pradimicin antibiotics. III. Spectrophotometric sequence analysis of the ternary complex formation of BMY-28864 with D-mannopyranoside and calcium. *J. Antibiot.* **1993**, 46, 465-477; b) Nakagawaa, Y.; Doi, T.; Takegoshi, K.; Igarashi, Y. and Ito, Y. Solid-state NMR analysis of calcium and d-mannose binding of BMY-28864, a water-soluble analogue of pradimicin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 1040–1043.

36. Vzorov, A. N.; Marzilli, L. G.; Compans, R. W.; Dixon, D. W. Prevention of HIV-1 infection by phthalocyanines. *Antiviral Res.* **2003**, 59, 99-109.
37. Francois, K. O.; Pannecouque, C.; Auwerx, J.; Lozano, V.; Pérez-Pérez, M. J.; Schols, D.; Balzarini, J. The phthalocyanine prototype derivative alcian blue is the first synthetic agent with selective anti-human immunodeficiency virus activity due to its gp120 glycan-binding potential. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 4852-4859.
38. a) Lis, H. and Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem. Rev.*, **1998**, 98 (2), 637-674;
39. b) Lee, Y. C. and Lee, R.T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321-327.
40. a) Mammen, M.; Choi, S.-K. and Whitesides, G.M. Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37 (20), 2755-2794; b) Kiessling, L.L.; Gestwicki, J.E.; Cairo, C.W.; Strong, L.E. and Oetjen, K.A. Influencing Receptor-Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (50), 14922-14933; b) Liu, Y.A.; Carroll, J.R.; Holt, L.A.; McMahon, J.; Giomarelli, B. and Ghirlanda, G. Multivalent Interactions with gp120 Are Required for the Anti-HIV Activity of Cyanovirin. *Biopolymers* **2009**, 92 (3), 194-200.
41. a) Sharon, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1760, 527-537; b) Williams, D.C. Jr.; Lee, J.Y.; Cai, M.; Bewley, C.A. and Clore, G.M. Crystal Structures of the HIV-1 Inhibitory Cyanobacterial Protein MVL Free and Bound to Man3GlcNAc2: Structural Basis For Specificity and High-Affinity Binding to the Core Pentasaccharide from N-Linked Oligomannoside. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (32), 29269-29276.
42. a) Sauter, N.; Hanson, J.; Glick, G.; Brown, J.; Crowther, R. and Park, S. Binding of Influenza-Virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid- Analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-Ray crystallography. *Biochemistry* **1992**, 31 (40), 9609-9621; b) Pascal, J.; Day, P.; Monzingo, A.; Ernst, S.; Robertus, J. and Iglesias, R. 2.8-angstrom crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin 1. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **2001**, 43 (3),

- 319-326; c) Fernández-Alonso, M.C. Interacciones proteína-carbohidrato: Estudio Teórico de los requisitos energéticos para la distorsión de anillos de piranosa y origen de las interacciones carbohidrato-anillo aromático. Universidad de Vigo-Centro de Investigaciones Biológicas, Vigo, **2006**.
43. Fernández-Alonso, M.C.; Cañada, F.; Jiménez-Barbero, J. and Cuevas, G. Molecular recognition of saccharides by proteins. Insights on the origin of the carbohydrate-aromatic interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (20), 7379-7386.
44. a) Nativi, C.; Cacciarini, M.; Francesconi, O.; Vacca, A.; Moneti, G.; Ienco, A. and Roelens, S. Pyrrolic Tripodal Receptors Effectively Recognizing Monosaccharides. Affinity Assessment through a Generalized Binding Descriptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 4377-4385; b) Kuschel, M. and Mazik, M. Highly effective acyclic carbohydrate receptors consisting of aminopyridine, imidazole, and indole recognition units. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14 (8), 2405-2419.
45. Ferrand, Y.; Crump, M. P.; Davis, A. P. A synthetic lectin analog for biomimetic disaccharide recognition. *Science* **2007**, 318, 619-622.
46. Howgego, J. D.; Butts, C. P.; Crump, M. P. and Davis, A. P. An accessible bicyclic architecture for synthetic lectins. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 3110-3112.
47. Joshi, G. and Davis, A. P. New H-bonding patterns in biphenyl-based synthetic lectins; pyrroliediamine bridges enhance glucose-selectivity. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 5760-5763.
48. a) Davis, A. P. Syntetic Lectins. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (18), 3629-3638; b) Kubik, S. Syntetic Lectins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (10), 1722-1725.
49. Anslyn, E. and Hennrich, G. 1,3,5-2,4,6-functionalized, facially segregated benzenes - Exploitation of sterically predisposed systems in supramolecular chemistry. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8 (10), 2219-2224.
50. a) Nativi, C.; Cacciarini, M.; Pergoli, R.; Roelens, S. and Vacca, A. A new tripodal receptor for molecular recognition of monosaccharides. A paradigm for assessing glycoside binding affinities and selectivities by H-1 NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (50), 16456-16466; b) Cavga, H. and Mazik, M. Molecular recognition of N-acetylneuraminic acid with acyclic benzimidazolium- and aminopyridine/guanidinium-

- based receptors. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (3), 831-838; c) Buthe, A. and Mazik, M. Highly effective receptors showing di- vs. monosaccharide preference. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6 (9), 1558-1568, d) Kuschel, M. and Mazik, M. Amide, amino, hydroxy and aminopyridine groups as building blocks for carbohydrate receptors. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 9, 1517-1526, e) Kuschel, M. and Mazik, M. Highly effective acyclic carbohydrate receptors consisting of aminopyridine, imidazole, and indole recognition units. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14 (8), 2405-2419; f) Abe, H.; Aoyagi, Y. and Inouye, M. A rigid C-3v-symmetrical host for saccharide recognition: 1,3,5-tris(2-hydroxyaryl)-2,4,6-trimethylbenzenes. *Org. Lett.* **2005**, 7 (1), 59-61; g) Schmuck, C. and Schwegmann, M. Recognition of anionic carbohydrates by an artificial receptor in water. *Org. Lett.* **2005**, 7 (16), 3517-3520.
51. Scanlan, C. N.; Offer, J.; Zitzmann, N. and Dwek, R. A. Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* **2007**, 446, 1038-1045.
52. Reitter, J. N.; Means, R. E. and Desroiers, R. C. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS *Nat. Med.* **1998**, 4 (6), 679-684.
53. (a) Polifenoles como miméticos de lectinas: Una nueva aproximación en la terapia del SIDA. Tesis doctoral, Paula Carrero Berzal **2010**; b) Balzarini, J.; Carrero, P.; Casanova, E.; Pérez-Pérez, M. J. and San-Félix, A. Gp120-binding benzene compounds and saccharide compounds. WO2011085454 (A1), **2011**.
54. Carrero, P.; Ardá, A.; Álvarez, M.; Doyagüez, E. G.; Rivero-Buceta, E.; Quesada, E.; Prieto, A.; Solís, D.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Jiménez-Barbero, J. and San-Félix, A. Differential Recognition of Mannose-Based Polysaccharides by Tripodal Receptors Based on a Triethylbenzene Scaffold Substituted with Trihydroxybenzoyl Moieties. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 65-76.
55. Lozano, V.; Aguado, L.; Hoorelbeke, B.; Renders, M.; Camarasa, M.J.; Schols, D.; Balzarini, J.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M.J. Targeting HIV Entry through Interaction with Envelope Glycoprotein 120 (gp120): Synthesis and Antiviral Evaluation of 1,3,5-Triazines with Aromatic Amino Acids *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (15), 5335-5348.

Capítulo 1

Polifenoles derivados de trietilbenceno

El trabajo que se describe en el presente capítulo tiene como punto de partida el compuesto **AL-170**¹ (Figura 1), descubierto en nuestro grupo de investigación. El rasgo estructural más importante de **AL-170** es la presencia de un anillo de trietilbenceno sustituido con anillos fenólicos con los OHs en posición 2,3,4.

Para el diseño del compuesto **AL-170** nos inspiramos en la estructura de los polifenoles naturales. Numerosos precedentes bibliográficos indican que dichos compuestos son moléculas anfipáticas que presentan anillos aromáticos hidrófobos y grupos hidrófilos (hidroxilos), lo que les permite unirse simultáneamente a la superficie de diferentes tipos de macromoléculas, incluyendo polisacáridos. En su unión a dichas moléculas la parte hidrofóbica es la responsable de la asociación mediante interacciones CH- π , mientras que los OHs son los responsables de la formación de puentes de hidrógeno. Además, factores tales como el tamaño molecular, la conformación y el número y posición de los grupos hidroxilo libres de los anillos fenólicos afectan tanto a la capacidad de unión como a la selectividad de la misma.

Como ya se ha mencionado, estudios biológicos demostraron que **AL-170** inhibía la replicación del VIH-1 a nivel micromolar ($EC_{50} = 6.3 \pm 0.7 \mu M$; $CC_{50} = 184 \pm 14 \mu M$) y estudios de RMN en DMSO demostraron que dicho compuesto interacciona con oligosacáridos de manosa similares a los presentes en la cubierta del VIH.

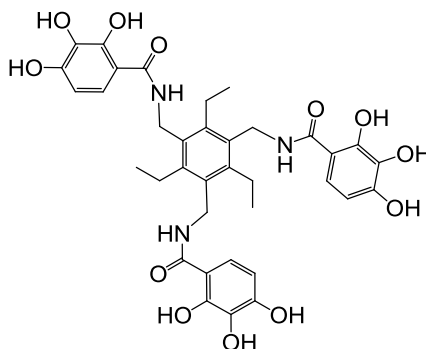


Figura 1. Estructura del compuesto prototipo AL-170

En base a todo ello, en el presente capítulo nos proponemos en primer lugar determinar si **AL-170** es capaz de interactuar con los carbohidratos de la cubierta del VIH y en segundo optimizar nuestro prototipo **AL-170** con el fin de obtener nuevos compuestos más activos y menos tóxicos con los que poder realizar estudios de resistencia. Por último, dada la estructura polifenólica de **AL-170** y la conocida capacidad antioxidante de los polifenoles, nos proponemos determinar las propiedades antioxidantes de **AL-170**.

Nuestros objetivos concretos son los siguientes:

- 1.- Determinar la influencia del número y posición de los OHs fenólicos en la actividad para lo cual decidimos preparar derivados de trietilbenceno sustituidos con anillos fenólicos con 2 y 3 OHs en distinta posición (compuestos **I - IV**, Figura 2).
- 2.- Conocer la influencia de la aromaticidad en la actividad para lo cual se sustituirán los anillos fenólicos del prototipo por anillos no aromáticos (compuestos **V y VI**, Figura 2).
- 3.- Sustituir los anillos fenólicos del prototipo por otros anillos tales como aminopiridina, anilina, pirrol y 7-azaindol con reconocida capacidad para formar enlaces de hidrógeno (Figura 2, compuestos **VII - X**).

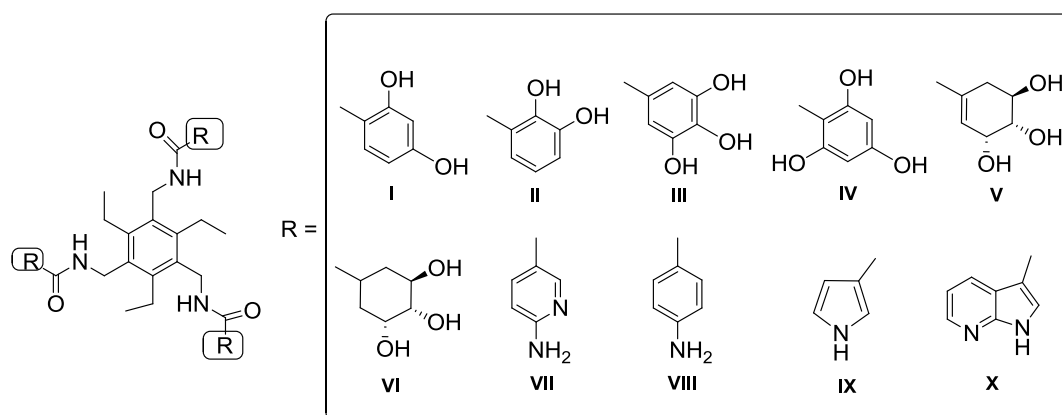


Figura 2. Fórmula general de los compuestos I - X

- 4.- Aumentar la distancia entre el esqueleto central y los anillos fenólicos para facilitar la interacción con los carbohidratos de la cubierta del VIH. Para ello decidimos preparar derivados de trietilbenceno en los que los residuos fenólicos se unen al esqueleto central a través de espaciadores flexibles con 2 y 4 metilenos o anillos tales como el de piperazina que proporcionan mayor restricción conformacional (compuestos **XI - XIII**, Figura 3).

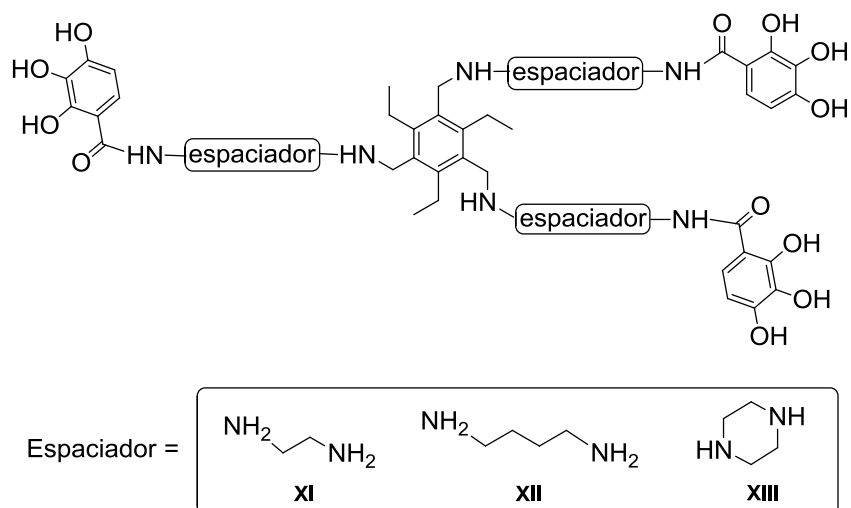


Figura 3. Fórmula general de los compuestos XI-XIII

5.- Aumentar el número de residuos fenólicos, a fin de aumentar el número de interacciones, para lo cual preparamos un compuesto con 6 anillos fenólicos en la periferia (Figura 4).

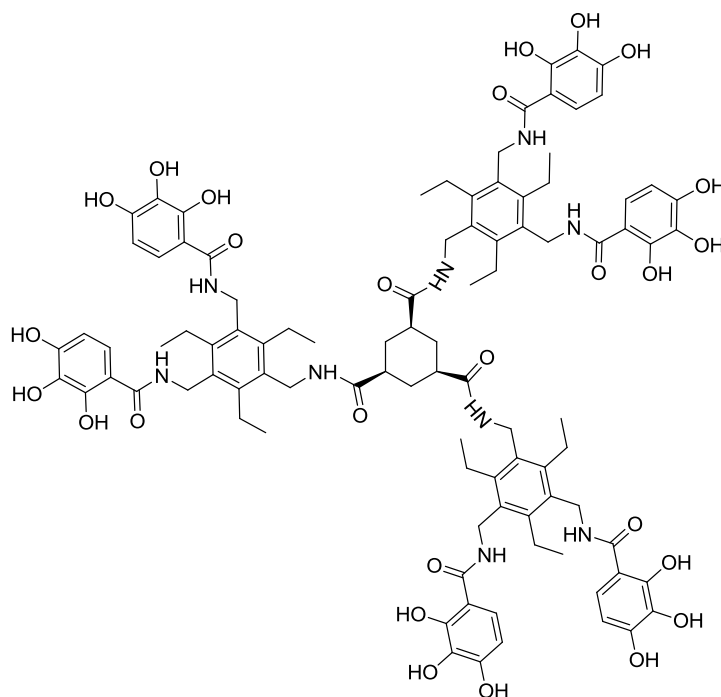
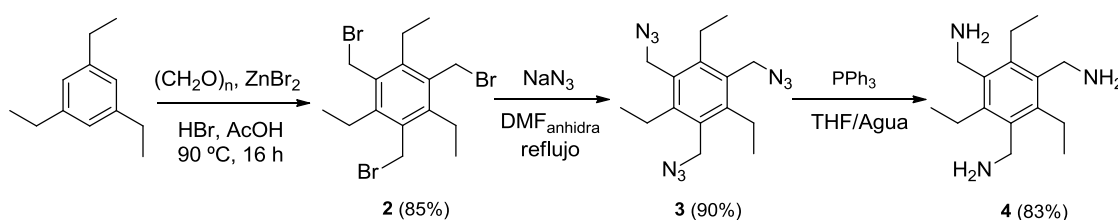


Figura 4. Fórmula del compuesto con mayor número de residuos fenólicos

DISCUSION DE RESULTADOS

Síntesis de los derivados fenólicos

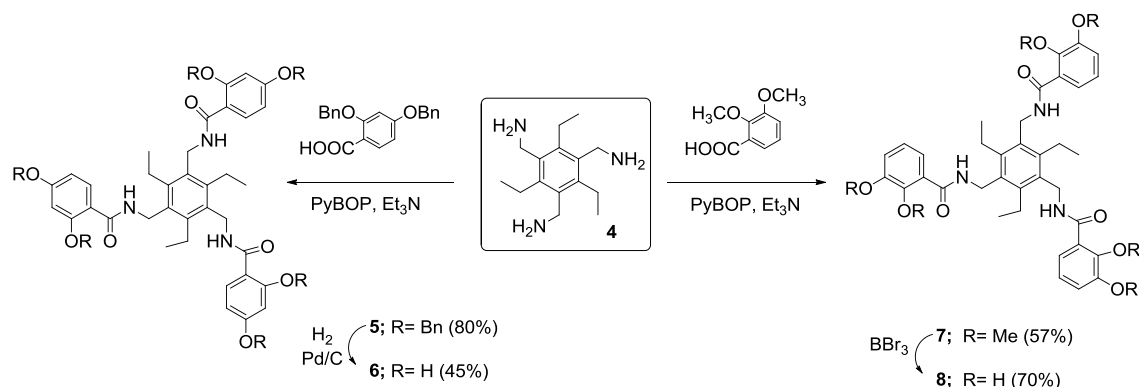
Para conseguir compuestos más activos y menos tóxicos decidimos mantener el esqueleto central de trietilbenceno presente en el prototipo **AL-170**¹ llevándose a cabo modificaciones en la periferia (anillos fenólicos). Para preparar dichos compuestos resultaron claves los derivados de trietilbenceno **2**³ y **4**³ cuya síntesis se describe en el esquema 1. La síntesis de **2** y **4** comienza con la reacción de trietilbenceno con paraformaldehído en presencia de bromo para obtener el tribromo derivado **2** con un 85% de rendimiento. El tratamiento de **2** con azida sódica conduce a la triazida **3**^{3c} con un 90% de rendimiento. La reducción de Staudinger de **3** empleando trifenilfosfina² conduce a la triamina **4** con muy buen rendimiento (83%).



Esquema 1. Síntesis de la triamina **4**

Una vez obtenidos los compuestos **2** y **4** se abordó la síntesis de los compuestos propuestos en los objetivos.

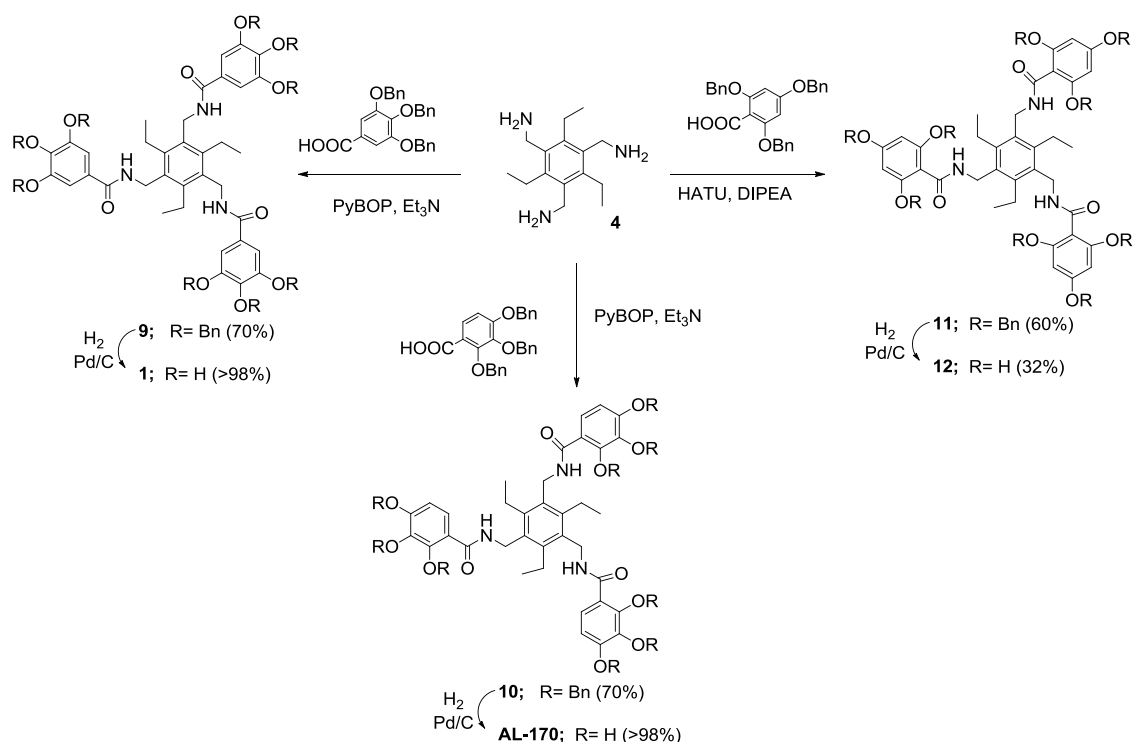
En primer lugar, llevamos a cabo la síntesis de los compuestos con 2 OHs fenólicos separados por un átomo de carbono (compuesto **6**) o en posición contigua (compuesto **8**) (Esquema 2). Para la síntesis de **6**, la triamina **4** se hizo reaccionar con el ácido 2,4-dibenciloxibenzoico⁴ en presencia de PyBOP como agente de acoplamiento y trietilamina como base, obteniéndose el compuesto **5** (80%) cuya hidrogenación en presencia de Pd/C dio lugar al compuesto **6** (Esquema 2).^{1a,5}. De manera análoga el acoplamiento de la triamina **4** con ácido 2,3-dimetiloxibenzoico en presencia de PyBOP y trietilamina condujo al compuesto **7** con un 57% de rendimiento. En este compuesto, la desprotección de los éteres metílicos se llevó a cabo empleando tribromuro de boro obteniéndose el compuesto desprotegido **8** con un 70% de rendimiento.



Esquema 2. Síntesis de los compuestos 6 y 8

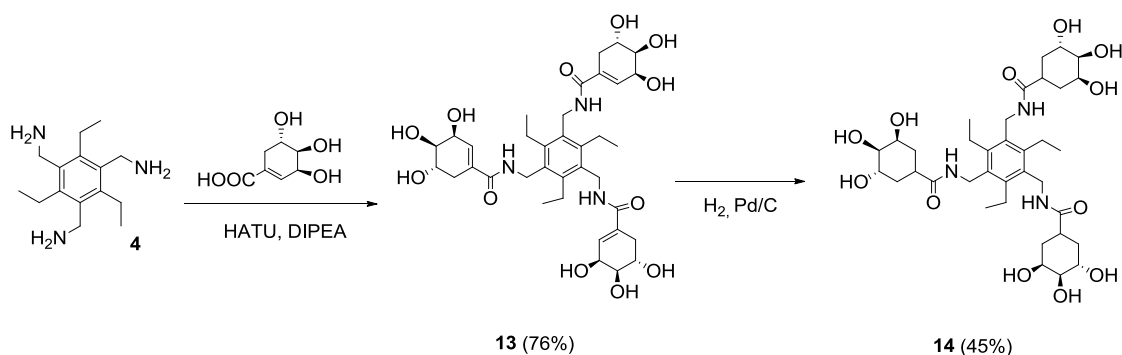
Seguidamente se prepararon los compuestos con 3 OHs fenólicos sobre el anillo aromático siguiendo la ruta sintética que se refleja en el esquema 3. Entre ellos figura el compuesto prototipo **AL-170**¹ cuya síntesis fue necesaria repetir para determinar su capacidad de unión a la gp120 mediante ensayos de Resonancia de Plasmón de Superficie, tal y como se discutirá más adelante.

El acoplamiento de la triamina **4** con los ácidos 3,4,5-tribenciloxibenzoico⁶ y 2,3,4-tribenciloxibenzoico⁷ en presencia de PyBOP y trietilamina¹ condujo a los derivados bencilados **9** y **10** con un 70% de rendimiento en ambos casos (Esquema 3). Cuando se emplearon estas mismas condiciones para la síntesis de **12** con los 3 OH en las posiciones 2, 4 y 6 del anillo aromático no se consiguió el compuesto deseado recuperándose en su lugar el ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico⁸ de partida, por lo que fue necesario emplear condiciones más enérgicas (HATU y DIPEA) para obtener el compuesto deseado **12**. La desprotección de los grupos bencilo presentes en **9**, **10** y **11** por hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C (10%) condujo a los compuestos deseados **1**¹, **AL-170**¹ y **12** con rendimientos superiores al 98% (**1** y **AL-170**) y del 32% (**12**).



Esquema 3. Síntesis de los compuestos 1, AL-170 y 12

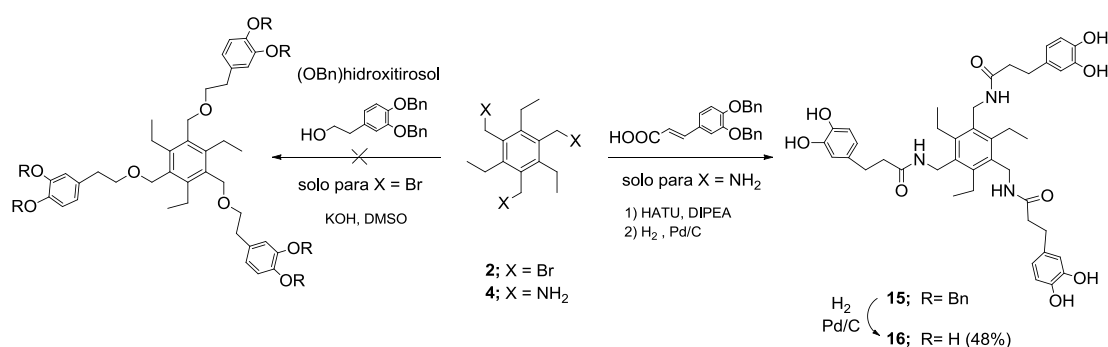
Con el fin de conocer la influencia en la actividad tanto de la flexibilidad como de la aromaticidad de los anillos situados en la periferia, se sintetizó el compuesto **13** con tres anillos insaturados y **14** con tres anillos totalmente saturados. La síntesis de **13** se llevó a cabo mediante el acoplamiento de la triamina **4** con ácido siquímico en presencia de HATU y DIPEA. Posteriormente, se llevó a cabo la hidrogenación catalítica de **13** en presencia de Pd/C (10%), obteniéndose el compuesto saturado **14** con un 45% de rendimiento (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis del compuesto 14

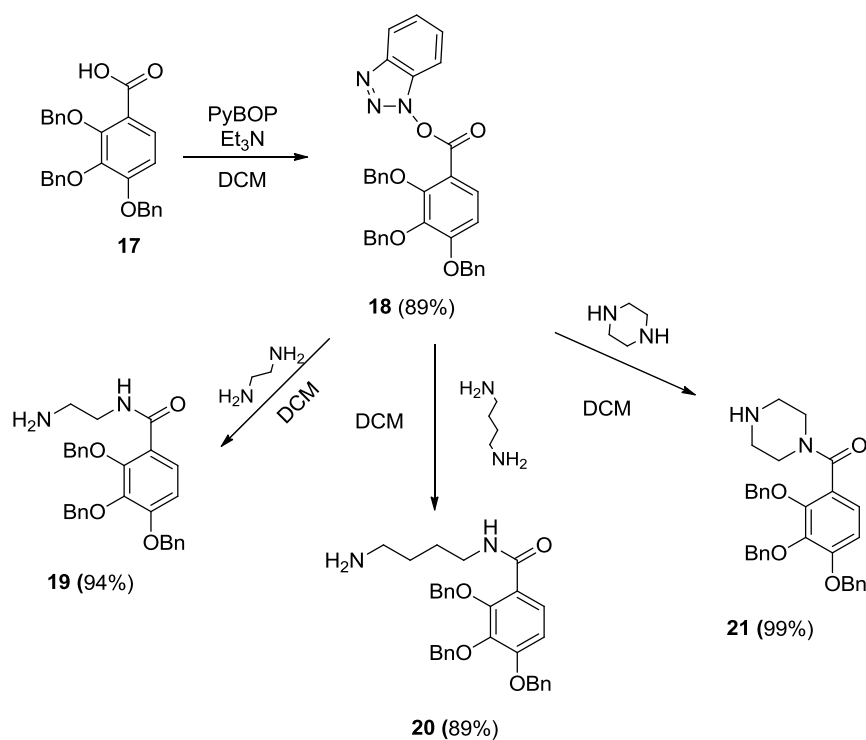
Tal y como se recoge en el segundo apartado de este capítulo, la actividad antioxidante de nuestros compuestos fenólicos podría ser una propiedad importante para detener el estrés oxidativo de muchas enfermedades. El hidroxitirosol es un polifenol, presente en el aceite de

oliva, con reconocida actividad antioxidante.⁹ Basándonos en ello, decidimos incorporar tres unidades del mismo como sustituyentes del trietilbenceno (Esquema 5). Para llevar a cabo la síntesis de este compuesto, empleamos el tribromo derivado **2** como compuesto de partida. Sin embargo, la reacción de **2** con el derivado de hidroxitirosol bencilado¹⁰ en presencia de hidróxido sódico y DMSO no condujo al compuesto deseado, en el que el trietilbenceno y el hidroxitirosol se unirían a través de un enlace éter, y recuperamos el derivado de hidroxitirosol de partida inalterado. Por ello, decidimos preparar el compuesto **16**, en el que el trietilbenceno y el resto de 3,4-dihidroxifeniletilo presente en el hidroxitirosol se unen mediante un enlace amida y no a través de un enlace éter.¹¹ La síntesis de **16** se llevó a cabo por reacción de la triamina **4** con ácido cafeico bencilado¹² seguido de hidrogenación catalítica del compuesto resultante **15** con Pd/C. En esta reacción tiene lugar la reducción del doble enlace y la eliminación simultánea de los grupos bencilo del anillo fenólico (Esquema 5).



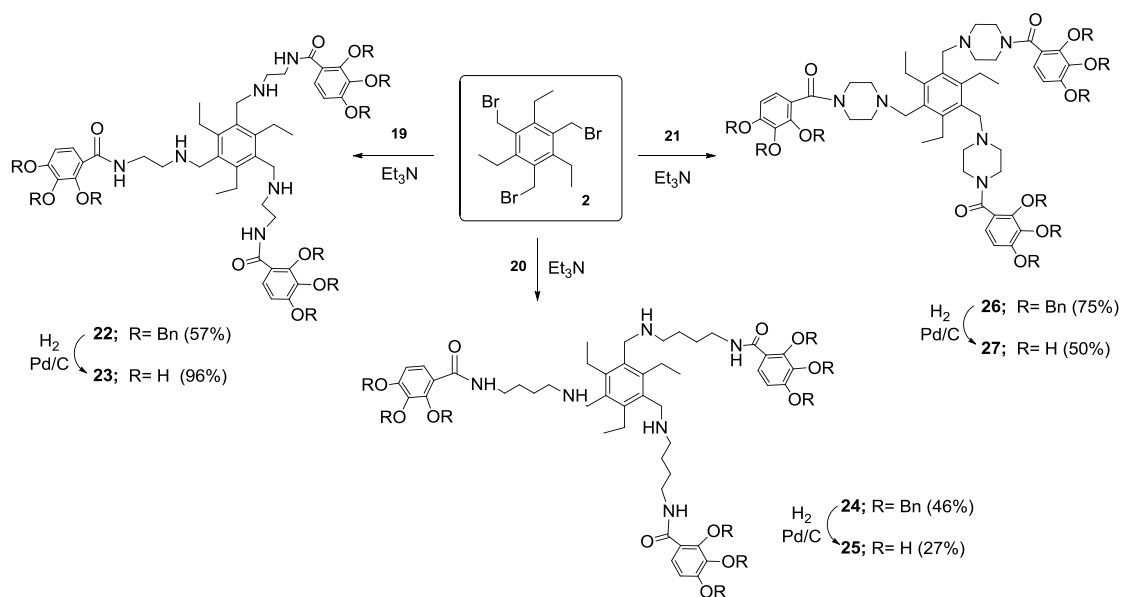
Con el fin de determinar si la distancia entre el esqueleto central y el anillo fenólico es un factor importante para la actividad, decidimos sintetizar los compuestos **23**, **25** y **27** (Esquema 7). En el compuesto **23**, la distancia entre el anillo central y los anillos fenólicos de la periferia se alarga en dos metilenos mediante la incorporación de etilendiamina; en **25** el espaciador empleado fue 1,4-butanodiamina, con cuatro metilenos, y en **27** el espaciador fue un anillo de piperazina. En este último caso, el anillo de piperazina sería capaz de restringir la libertad conformacional en comparación con los otros dos espaciadores metilénicos.

La síntesis de dichos compuestos se llevó a cabo en dos pasos sucesivos y comienza con la preparación del intermedio común **18** (Esquema 6).



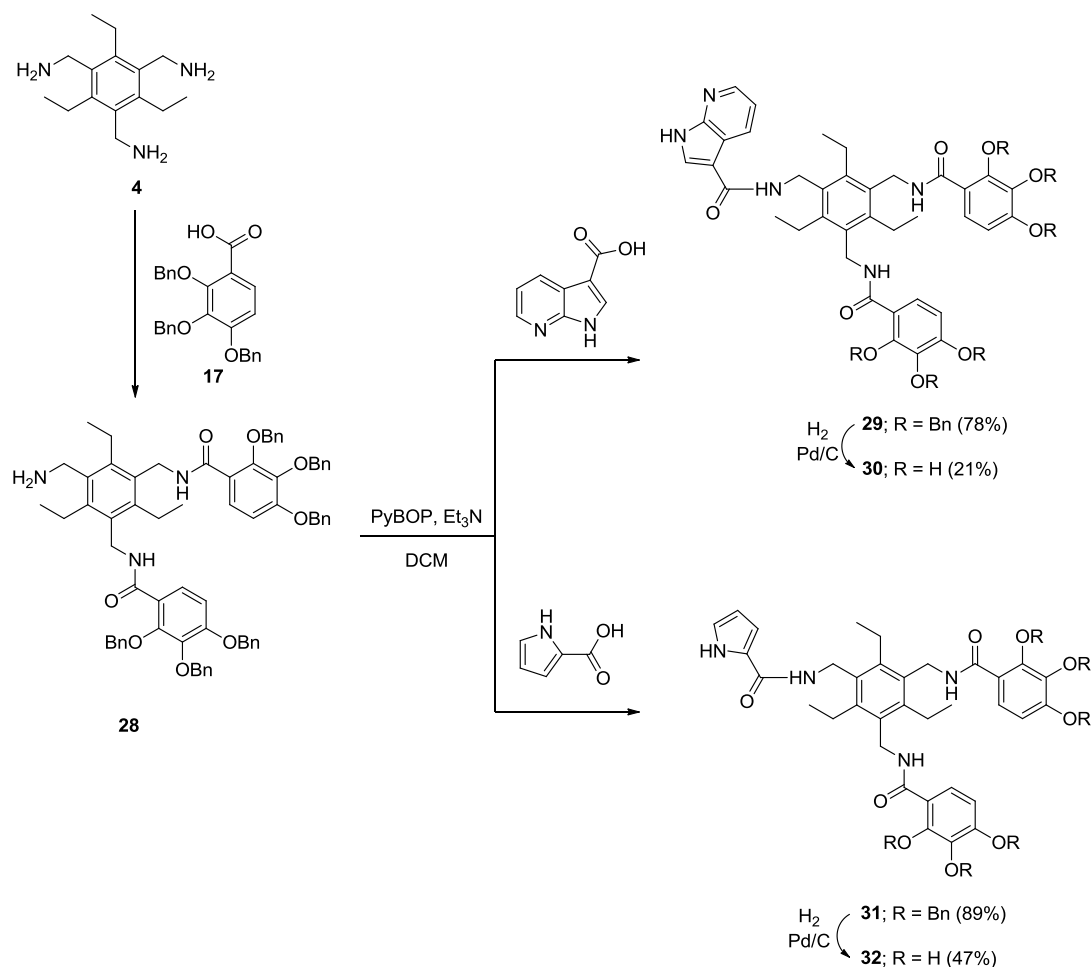
Esquema 6. Síntesis de los compuestos 19, 20 y 21

Dicho compuesto se obtuvo con un 89% de rendimiento por reacción de **17** con PyBOP y trietilamina. Seguidamente, la reacción de **18** con etilendiamina, 1,4-butanodiamina y piperazina condujo a las aminas **19** (94%), **20** (89%) y **21** (99%) respectivamente. La reacción de dichas aminas **19** - **21** con el tribromo derivado **2** en presencia de trietilamina condujo a los compuestos **22** (57%), **24** (46%) y **26** (75%) (Esquema 7) cuya hidrogenación en presencia de Pd/C (10%) condujo a los derivados desprotegidos buscados **23** (96 %), **25** (27 %) y **27** (50 %).



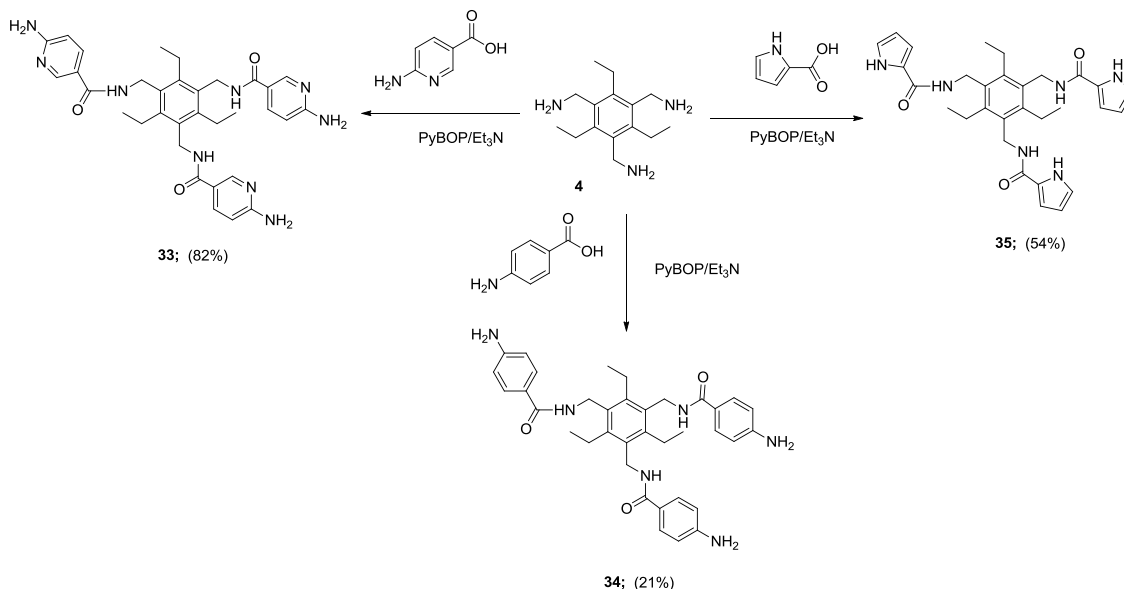
Esquema 7. Síntesis de los compuestos 23, 25 y 27

Al igual que sucede en los compuestos naturales, pensamos que mediante la incorporación de diferentes grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno como sustituyentes del trietilbenceno se podría conseguir una mejor unión a los glicanos de alto contenido en manosa presentes en la superficie de gp120. Por esta razón y en base a las conocidas propiedades del 7-azaindol¹³ o del pirrol¹⁴ para formar enlaces de hidrógeno, preparamos los compuestos **30** y **32** (Esquema 8) que incorporan dichos residuos como sustituyentes del trietilbenceno en combinación con dos residuos de ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico. Para llevar a cabo la síntesis de los compuestos **30** y **32**, primeramente se preparó la amina disustituida con anillos fenólicos **28** por reacción de la triamina **4** con dos equivalentes de ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico. Seguidamente, el compuesto **28** se hizo reaccionar con los ácidos comerciales 7-azaindol-3-carboxílico y 1-H-pirrol-2-carboxílico, obteniéndose los intermedios **29** y **31** con buenos rendimientos (78% y 89%, respectivamente). La desprotección de los grupos hidroxilo mediante hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C (10%) permitió obtener los compuestos **30** (21 %) y **32** (47 %), respectivamente.


 Esquema 8. Síntesis de los compuestos **30** y **32**

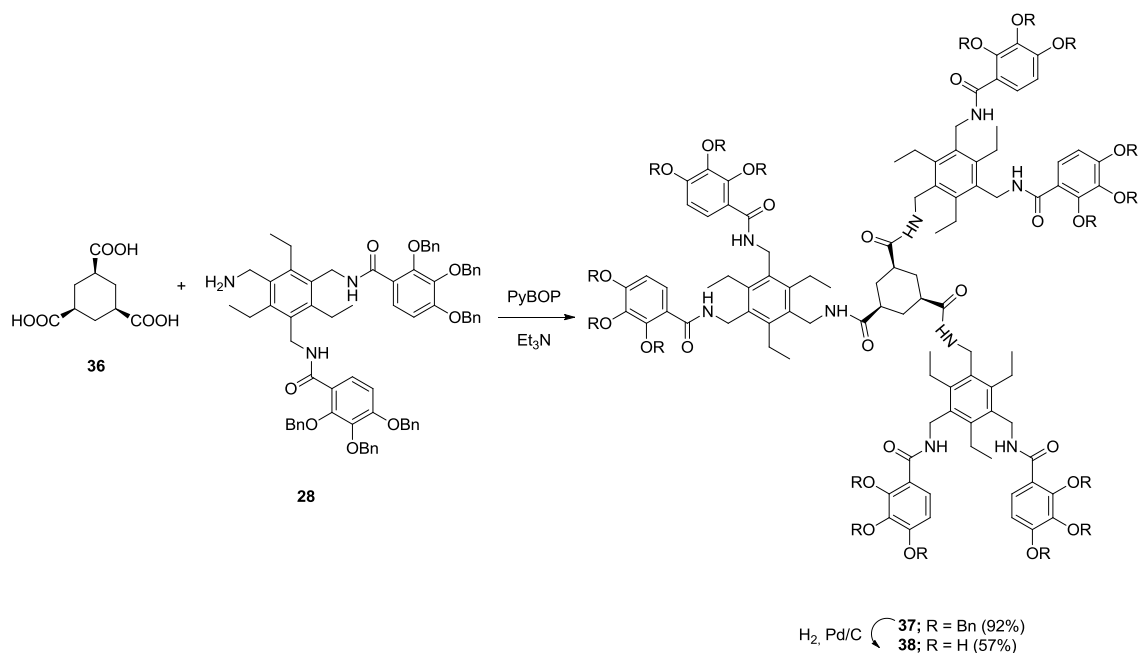
Tal y como se comentó en la introducción, la síntesis de receptores tripodales basados en el anillo de trietilbenceno para el reconocimiento de carbohidratos, ha sido explorada exhaustivamente por el grupo de Mónica Mazik.¹⁵ Entre los grupos elegidos como sustituyentes de dicho anillo figura el anillo de aminopiridina. Así, en estudios de RMN realizados por este grupo se demuestra que en medios apolares (cloroformo) el anillo de trietilbenceno que incorpora tres residuos de aminopiridina es capaz de unirse a alquil piranósidos con considerable afinidad y selectividad formando complejos de estequiometría 1:1 y 1:2. Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos preparar el compuesto **33** con 3 aminopiridinas como sustituyentes del trietilbenceno. Además, preparamos los compuestos **34** y **35** con tres unidades de anilina o de pirrol respectivamente como sustituyentes del trietilbenceno. Los compuestos **33** (82%), **34** (21%) y **35** (54%) en los que este tipo de anillos estaban presentes, se prepararon a partir del acoplamiento de la triamina **4** con el correspondiente ácido

carboxílico en presencia de PyBOP y trietilamina (Esquema 9). Cabe mencionar que aunque la síntesis del compuesto **35** estaba descrita,¹⁶ la actividad antiviral de este compuesto era completamente desconocida.



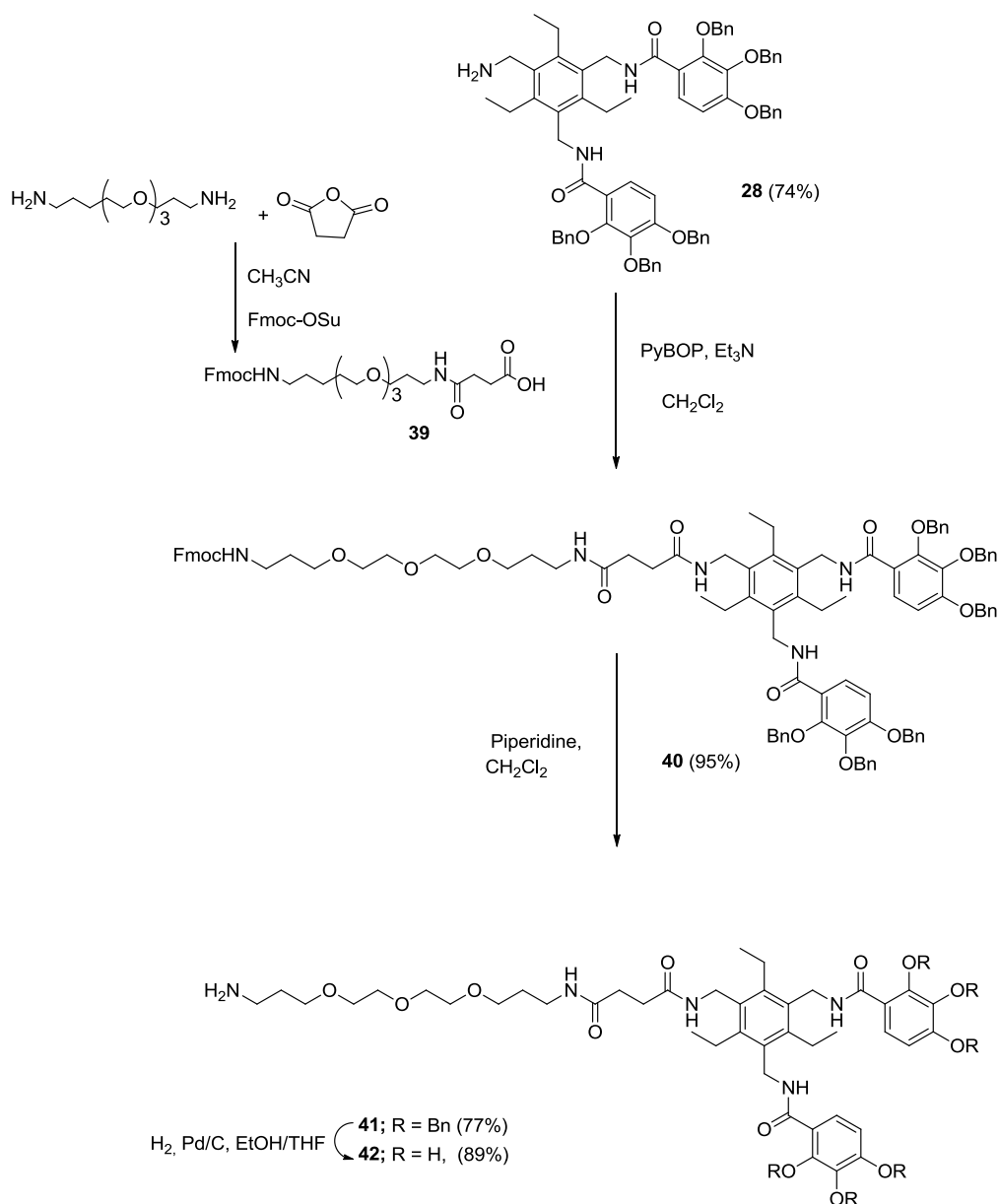
Esquema 9. Síntesis de los compuestos **33** – **35**

Dado que por lo general, la estructura de muchos polifenoles naturales contiene múltiples anillos fenólicos y con el fin de aumentar el número de residuos fenólicos en una misma molécula, decidimos sintetizar el compuesto **38** con seis unidades fenólicas en la periferia, en lugar de tres (Esquema 10). Nuestra hipótesis era que la introducción de más unidades fenólicas en la periferia podría lograr un mayor número de interacciones con los glicanos de alto contenido en manosa presentes en la superficie de gp120. En este caso, como núcleo central se utilizó ácido *cis*-1,3,5-ciclohexanotricarboxílico (**36**) que en comparación con el trietilbenceno presenta menos restricción conformacional. La disposición espacial de **36** podría favorecer el que los “brazos” tuvieran más espacio para colocarse y evitar los posibles impedimentos estéricos que podrían darse en la conformación prefijada del núcleo de trietilbenceno.¹⁷ Para llevar a cabo la síntesis, el ácido **36** se hizo reaccionar con la amina disustituida **28** empleando PyBOP como agente de acoplamiento, obteniéndose el derivado protegido **37** (92%). La desprotección de los éteres bencílicos de **37**, mediante hidrogenación catalítica empleando Pd/C (10%), condujo al compuesto desprotegido deseado **38** (57%).



Esquema 10. Síntesis del compuesto 38

Por último, tal y como veremos en la sección de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) fue necesario preparar el compuesto **42**. Dicho compuesto es un análogo del compuesto **AL-170** que contiene el espaciador **39** con un grupo amino terminal, adecuado para su unión covalente al chip biosensor que emplearemos en el experimento de SPR (Esquema 11). El espaciador **39** debe de ser suficientemente largo para permitir la unión de **42** a la superficie del chip biosensor sin interferir en el proceso de unión. El espaciador **39** se preparó siguiendo el procedimiento descrito en la literatura,¹⁸ a partir del ácido Fmoc-18-amino-4-oxo-9,12,15-trioxa-5-aminoctadecanoico, disponible comercialmente, por reacción con anhídrido succínico y posterior protección del grupo amino con N-(9-fluorenilmetoxycarbonilo) succinimida (Fmoc-Osu). La reacción del derivado disustituido **28** con el espaciador **39** en presencia de PyBOP y trietilamina condujo al compuesto **40**. La posterior desprotección del grupo protector Fmoc utilizando 20 % de piperidina en DMF a temperatura ambiente condujo al compuesto **41** con un 77% de rendimiento. La desprotección de los éteres bencílicos de **41** mediante hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C (10%) condujo al compuesto **42** con un rendimiento del 89%.



Esquema 11. Síntesis del compuesto 42

Evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2 en cultivo celular

Paralelamente a la síntesis se ha estudiado, en el laboratorio del Dr. Jan Balzarini, de la Universidad Católica de Lovaina, la eficacia antiviral de los compuestos sintetizados frente a la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2), en cultivo celular empleando la línea celular CEM/0. La determinación de la actividad antiviral frente a VIH ha estado basada en la inhibición de la formación de sincitios o células gigantes siguiendo

procedimientos descritos.¹⁹ La actividad antiviral se expresa como CE_{50} o concentración efectiva 50, esto es, la concentración de compuesto que permite proteger al 50% de las células del efecto citopático del virus. Paralelamente, se ha evaluado la toxicidad de los compuestos que se expresa como CC_{50} o concentración citotóxica 50, que corresponde a la concentración de compuesto citotóxica para las células no infectadas. El cociente entre ambos factores (CC_{50}/CE_{50}) se denomina índice terapéutico, y da idea de la seguridad de un compuesto. En general se considera que la actividad antiviral de un compuesto es significativa cuando su índice terapéutico es mayor de 10.

Los resultados obtenidos de la evaluación biológica frente al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1 y VIH-2) de los compuestos con los OH fenólicos desprotegidos quedan recogidos en la Tabla 1. En la tabla se ha incluido como compuesto de referencia la pradimicina-A (PRM-A), una molécula pequeña que muestra actividad antiviral e interacciona con los glicanos de alto contenido en manosa presentes en la superficie de la glicoproteína gp120. También se incluye la actividad del ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico, del ácido gálico y del ácido ascórbico, un compuesto antioxidante muy conocido. Un análisis detallado de la actividad mostrada por los compuestos que aparecen en la Tabla 1 nos permite establecer una serie de conclusiones sobre la relación entre la estructura química y la actividad biológica.

Lo primero que cabe destacar es que los compuestos con los OH fenólicos protegidos como ésteres bencílicos o metílicos (no incluidos en la tabla) resultaron inactivos. Este resultado indica que la presencia de OH fenólicos desprotegidos es crucial para que los compuestos muestren actividad antiviral. Asimismo, el ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico, el ácido gálico y el ácido ascórbico resultaron inactivos.

Tal y como se refleja en la tabla, el prototipo **AL-170**¹, que posee un núcleo central de trietilbenceno sustituido con 3 anillos polifenólicos en los que los grupos OH ocupan las posiciones 2,3,4 resultó el único compuesto con actividad. Por el contrario, el compuesto **1**; portador de tres unidades de ácido gálico, y el compuesto **12**, portador de 3 anillos polifenólicos en los que los OH ocupan las posiciones 2,4,6 del anillo, resultaron inactivos. Estos datos sugieren que el anillo de 2,3,4-trihidroxifenilo conduce a compuestos más activos que sus

isómeros y que la disposición de los grupos hidroxilo alrededor del anillo aromático es de crucial importancia para la actividad antiviral.

Tabla 1. Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células CEM/0

Compuesto	EC ₅₀ (μM) ^a		CC ₅₀ (μM) ^b
	HIV-1	HIV-2	
L-(+)-ácido ascórbico (AA)	>250	>250	>250
Ácido gálico	>50	>50	>250
Ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico	>10	>10	>250
1	>10	>10	49 ± 2.6
1 + AA	>10	>10	29 ± 11
AL-170	6.3 ± 1.0	41 ± 14	144 ± 15
AL-170	>10	>10	46 ± 39
AL-170 + AA	4.2 ± 0.92	27 ± 9.2	91 ± 5.7
6	>4	>4	28 ± 1.4
8	>2	>2	5.0 ± 0.14
12	>50	>50	112 ± 4.2
12 + AA	>10	>10	22 ± 0.71
13	>250	>250	>250
14	>250	>250	>250
16	>10	>10	22 ± 0.71
16 + AA	>10	>10	29 ± 9.2
23	>10	>10	117 ± 3.5
25	>10	>10	25 ± 9.9
27	>10	>10	36 ± 25
30	>50	>50	92 ± 16
32	>10	>10	28 ± 8.5
33	>250	>250	>250
34	>250	>250	>250
35	>10*	>10*	>10*
38	>10	>10	25 ± 2.1
38 + AA	>10	>10	16 ± 7.3
PRM-A	3.4 ± 1.3		>50

^aCE₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios

^bCC₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular

*Se observó precipitación del compuesto a mayor concentración

No sólo la posición, sino también el número de grupos hidroxilo presentes en el anillo aromático parece ser importante para la actividad, tal y como lo demuestra la inactividad de **6** y **8** que únicamente se diferencian de **AL-170** en que presentan dos OH fenólicos en lugar de tres. Así que, en conclusión, la presencia de tres grupos OH consecutivos en las posiciones 2,3,4 del anillo aromático es un requisito necesario para la actividad antiviral.

La sustitución de alguno o los tres anillos fenólicos presentes en **AL-170** por otros residuos (compuestos **13**, **14**, **16**, **30**, **32**, **33**, **34** y **35**) así como el aumento de distancia entre el esqueleto central y el anillo fenólico (**23**, **25** y **27**) conduce en todos los casos a compuestos

inactivos. También lo fue el compuesto **38**, con 6 residuos fenólicos alrededor del esqueleto central.

El compuesto **AL-170** fue preparado de forma independiente varias veces para llevar a cabo los ensayos antivirales. En una de las ocasiones no presentó actividad antiviral. Esta falta de actividad podría deberse a la auto-oxidación que podría darse en medios acuosos. Este es un aspecto importante relacionado con el comportamiento de los polifenoles en medios acuosos que generalmente no se tiene en cuenta. La auto-oxidación es un fenómeno que se da en polifenoles y comúnmente se observa en condiciones oxidantes (oxígeno/agua).²⁰ Este fenómeno conduce a la formación de quinonas que pueden reaccionar con los grupos nucleófilos (por ejemplo, SH, NH₂) de proteínas o someterse a reacciones de polimerización más graduales que conducen a complejos oscuros de elevada masa molecular.²¹

Considerando la posibilidad de auto-oxidación de **AL-170** decidimos añadir ácido ascórbico (1:10 equivalentes) para prevenir este posible efecto. De esta manera, la auto-oxidación parece evitarse y el compuesto **AL-170**, que había resultado inactivo, recuperaba la actividad antiviral. Es importante destacar que la adición de ácido ascórbico en los compuestos **1**, **12**, **16** y **38** no supuso la recuperación de la actividad antiviral, lo que confirma la falta de actividad intrínseca de estos compuestos. Además, los datos obtenidos para el ácido ascórbico indican que no afecta a la actividad ni a la toxicidad.

Del estudio de la actividad antiviral podemos concluir que los requisitos estructurales en esta familia son muy estrictos y que tal y como se había descrito¹ el compuesto **AL-170** muestra una notable actividad anti-VIH. Es preciso comentar que para evitar la auto-oxidación de **AL-170** debemos de tomar ciertas precauciones como realizar los experimentos en presencia de antioxidantes como el ácido ascórbico (1:10 equivalentes).

Estudios de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR)

Uno de los objetivos de este capítulo es evaluar la capacidad del compuesto **AL-170** para interaccionar con los carbohidratos presentes en la glicoproteína gp120 presente en la envoltura del VIH en tiempo real. Para medir esta interacción hemos utilizado una técnica basada en un biosensor con detección por Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR). Este trabajo ha sido realizado en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina bajo la

supervisión del Dr. Jan Balzarini en un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

Introducción a la resonancia de plasmón de superficie (SPR)

La introducción a principios de los años 90 de una nueva tecnología de biosensores basada en el fenómeno de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) ha permitido la visualización en tiempo real del proceso de interacción entre biomoléculas. El uso de esta técnica se ha incrementado notablemente y su empleo se ha extendido a campos muy diversos. Así, en el sector alimentario se ha enfocado al control de calidad de productos, como determinación de carbohidratos, alcoholes, o colesterol, o bien la detección de patógenos y toxinas.²² También está siendo ampliamente utilizada en medicina, en investigación farmacéutica y biotecnológica para el descubrimiento de fármacos, en aplicaciones medioambientales y agroalimentarias y en defensa para la identificación de compuestos genotóxicos en medio acuoso y componentes neurotóxicos.

Esta técnica destaca por su gran versatilidad, puesto que permite el análisis de interacciones entre moléculas de muy diferente naturaleza y tamaño, en tiempo real y sin necesidad de ningún tipo de marcaje enzimático, fluorescente o radiactivo. Así, se pueden estudiar interacciones donde intervienen células, proteínas, ácidos nucleicos, glicanos e incluso compuestos de bajo peso molecular. Por otro lado, además de poder determinar constantes de afinidad a partir de estudios basados en el equilibrio, se pueden realizar estudios cinéticos, los cuales proporcionan información detallada acerca de la velocidad de formación y disociación del complejo.²³

En comparación con los métodos analíticos convencionales (cromatografía gaseosa, cromatografía líquida, espectrometría de masas) la técnica de SPR ofrece numerosas ventajas: es fácil de utilizar, consume pequeñas cantidades de muestra, (por ejemplo para la molécula que inmovilicemos podemos gastar entre 10-50 µg/mL y para el analito dependerá del tamaño y de la afinidad de la interacción, pero también suelen ser cantidades pequeñas), permite llevar a cabo detecciones directas y en tiempo real, no necesita marcaje, posee una elevada sensibilidad, se pueden llevar a cabo estudios a diferentes temperaturas, permite la reutilización del chip con la molécula inmovilizada y ofrece una gran versatilidad por lo que es una herramienta prometedora para la detección rápida de compuestos.

El principio que utiliza la técnica de SPR se basa en la reflexión interna total que ocurre cuando la luz polarizada que atraviesa un medio ópticamente denso (prisma) alcanza la interfase con otro medio de menor densidad óptica (disolución que contiene el analito a analizar). Al no ser capaz de atravesar la superficie entre ambos medios, el haz de luz se refleja completamente y esto ocurre siempre que el ángulo de incidencia supere un cierto valor crítico. Sin embargo, en el punto donde se produce la reflexión se genera un campo electromagnético que penetra en el medio de menor índice de refracción. Si la superficie del cristal está recubierta por una película metálica entonces la onda evanescente se acopla con los electrones del metal y se generan los denominados plasmones de superficie (Figura 1). El equipo va a monitorizar estos cambios en la intensidad de luz reflejada provocada por los cambios en el índice de refracción en el entorno cercano del metal. Así detectamos la interacción entre dos moléculas.

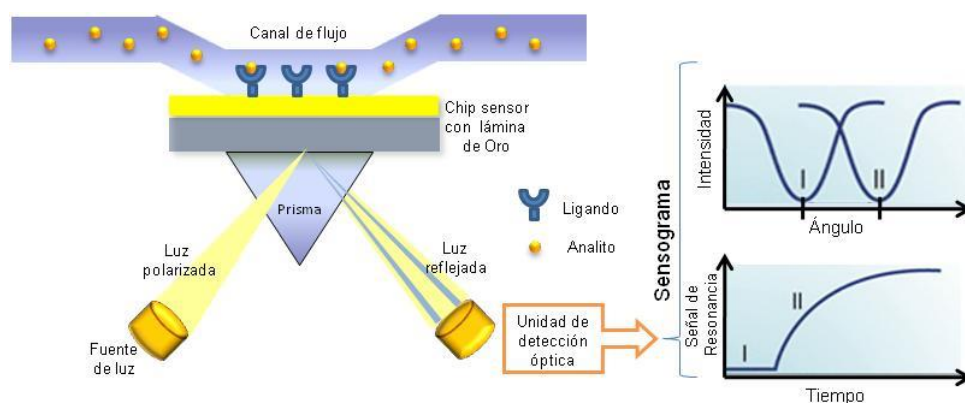


Figura 1. Esquema de funcionamiento de un biosensor de SPR

La luz que incide en dicha interfase, entre el metal y el prisma, provoca la excitación del plasmón superficial para un determinado ángulo de incidencia de dicha luz, llamado ángulo de resonancia. El ángulo de resonancia depende fuertemente del índice de refracción del medio colindante a la lámina metálica, por lo que las variaciones que se produzcan en el mismo van a ser detectadas como cambios del ángulo de resonancia. La unión de los analitos al elemento de reconocimiento supone un cambio de índice de refracción sobre la superficie del metal y, como consecuencia, un desplazamiento del ángulo de resonancia (de I a II en la gráfica superior derecha de la Figura 1). Estos cambios son proporcionales a la cantidad de sustrato unida a la superficie, mientras que la velocidad a la que se producen dichos cambios depende

de la cinética de interacción. Esto permite realizar medidas directas en tiempo real, sin marcaje, así como el análisis de muestras complejas sin purificación previa.^{23,24}

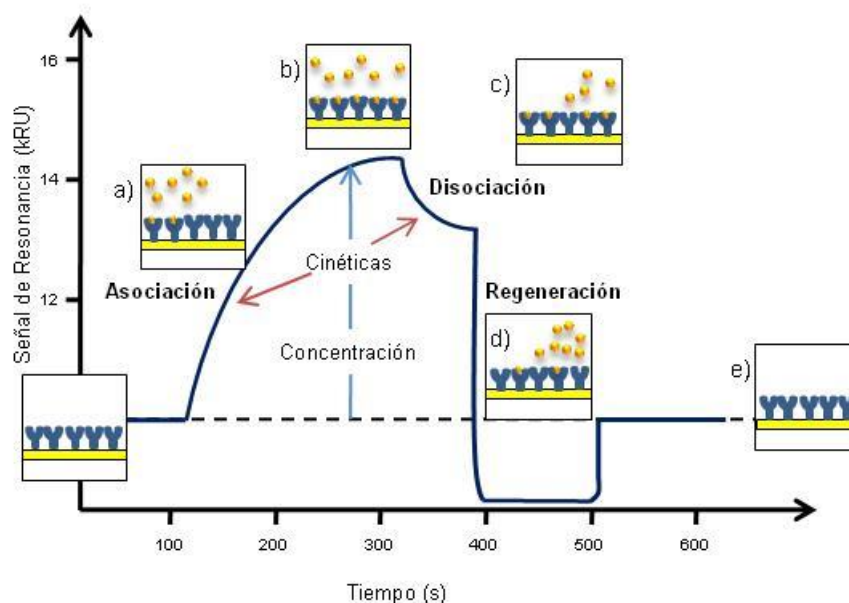


Figura 2. Modelo de sensorgrama

La relación entre la respuesta (en unidades de resonancia, RU) y el tiempo, en segundos, da lugar a lo que se denomina sensorgrama (Figura 2). La forma de la curva de un sensorgrama se debe a la aplicación del protocolo experimental siguiente: en primer lugar se inmoviliza un ligando (en nuestro caso gp120) al chip, a continuación se hace pasar una disolución tampón. A un tiempo determinado se hace pasar el analito (compuesto sintetizado), disuelto en la disolución tampón. Si existe una interacción entre el ligando anclado al chip y el analito, se dará un cambio en el índice de refracción lo que produce un incremento de la señal de resonancia (Figura 2.a) hasta que se llega al equilibrio (Figura 2.b). Del análisis de esta parte de la curva obtenemos la constante de asociación observada (k_{obs}) y si se conoce la concentración de analito en la disolución, podemos calcular la constante de asociación (k_a). Una vez llegado al equilibrio, se empieza a pasar de nuevo disolución tampón libre de analito, para favorecer la disociación ligando-analito, pudiéndose obtener del análisis de esta parte de la curva la constante de disociación (k_d) (Figura 2.c). Por último, se lleva a cabo la regeneración de la superficie del chip (Figura 2.d) eliminando todo el analito, con lo cual la superficie queda lista para una nueva medida (Figura 2.e). Este ciclo se suele repetir a diferentes

concentraciones para tener un mejor análisis cinético. Si se desea hacer un análisis termodinámico, se repite a diferentes temperaturas.^{24,25}

Preparación de la superficie del chip biosensor

Existen muchas estrategias para funcionalizar el chip, pudiéndose inmovilizar los ligandos de forma covalente o no covalente, generalmente a una cubierta polimérica. El polímero más habitual es el carboximetil dextrano, muy hidrofílico, lo que incrementa la capacidad de unión de la superficie a la vez que minimiza las interacciones inespecíficas. La matriz de dextrano es flexible, de forma que los ligandos anclados poseen cierta capacidad de movimiento en la superficie, mientras que los grupos carboxilos son empleados para la inmovilización covalente de ligandos.²⁶ La selección del método de inmovilización correcto requiere que se tengan en cuenta diferentes aspectos: i) la orientación resultante del ligando tras el acoplamiento, ii) el medio del que va a estar rodeado el ligando una vez anclado, y iii) la estabilidad del anclaje en las condiciones de regeneración del chip. Por lo tanto, el método escogido debe ser eficiente, debe dar lugar a un anclaje estable y debe permitir el control de la cantidad de ligando inmovilizado.

La estrategia más común de acoplamiento del ligando para los chips de oro que presentan el polímero de dextrano funcionalizado con ácidos carboxílicos es la activación *in situ* de dichos grupos con hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopiridil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (Figura 3). El éster activado resultante puede:

a) Acoplarse directamente con grupos amina del ligando (residuos de lisina si se trata de una proteína) para formar enlaces amida.

b) Derivatizarse con reactivos como la piridinilditioetanamina (PDEA) permitiendo el posterior acoplamiento con grupos tioles del ligando (residuos de cisteína y metionina si se trata de proteínas) formando puentes disulfuro.

c) Tratarse con hidracina y acoplarse con grupos aldehídos del ligando seguido con una posterior aminación reductiva.

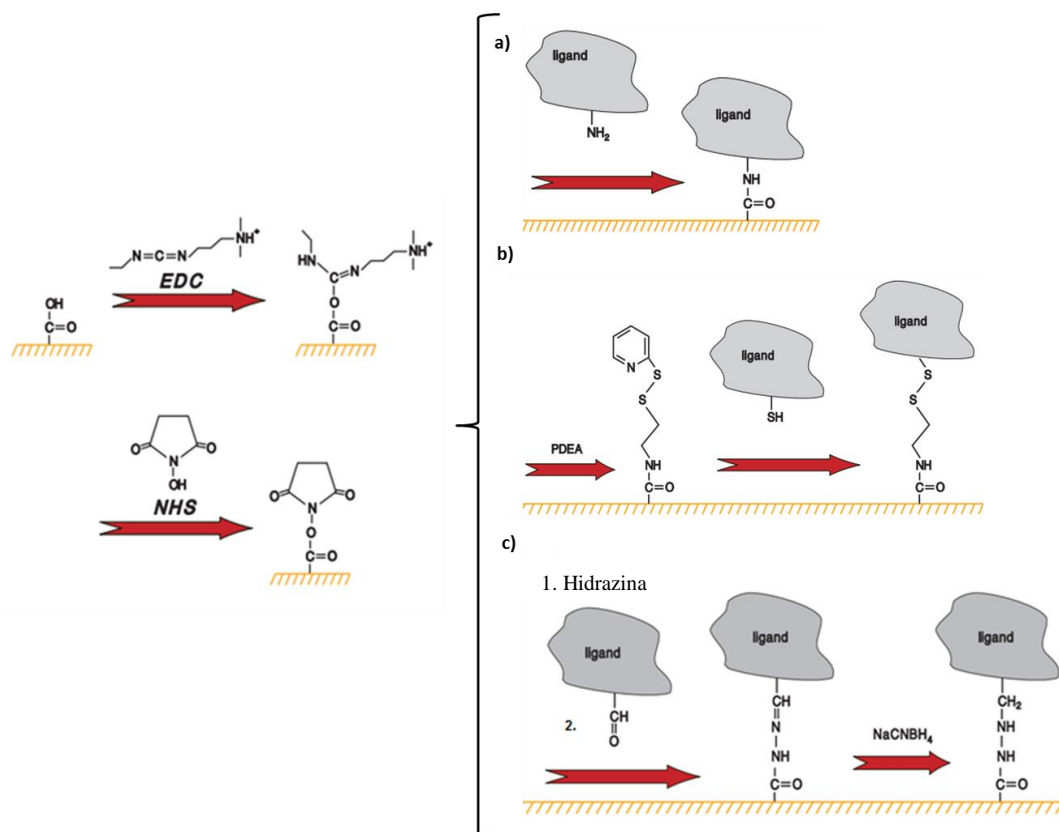


Figura 3. Inmovilización de ligando a través de su grupo amino

Estudio de la interacción del compuesto **AL-170** con la glicoproteína viral gp120 mediante SPR

Tal y como se ha comentado, uno de los objetivos del presente capítulo es evaluar la capacidad del compuesto **AL-170** para interaccionar con los carbohidratos presentes en la glicoproteína gp120 presente en la envoltura del VIH en tiempo real.

Los compuestos o analitos fueron disueltos en tampón HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl y 0,05% surfactante P20; pH 7.4), con un 5% de DMSO y en presencia de Ca^{2+} 10 mM. La superficie del chip se regeneró mediante una inyección de NaOH 50 mM durante 5 segundos, a una velocidad de flujo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. En nuestros estudios empleamos pradimicina-A (PRM-A) como compuesto de referencia. Así, PRM-A fue empleada en todos los estudios como control positivo de interacción y al mismo tiempo como control del estado del chip. Para llevar a cabo estos ensayos se empleó un chip con una densidad de 3012 RUs.

En la figura 4 se observa una respuesta intensa del compuesto **AL-170** a una concentración de 50 μM ; esta respuesta parece indicar que **AL-170** establece interacción con gp120. Por otra parte, mientras que la velocidad de asociación de **AL-170** a gp120 es del mismo orden de magnitud que la de la pradimicina A; la velocidad de disociación es mucho más lenta lo que podría deberse a fenómenos de autoagregación, y resultó difícil la regeneración del chip, por lo que no fue posible determinar la constante de asociación (K_D).

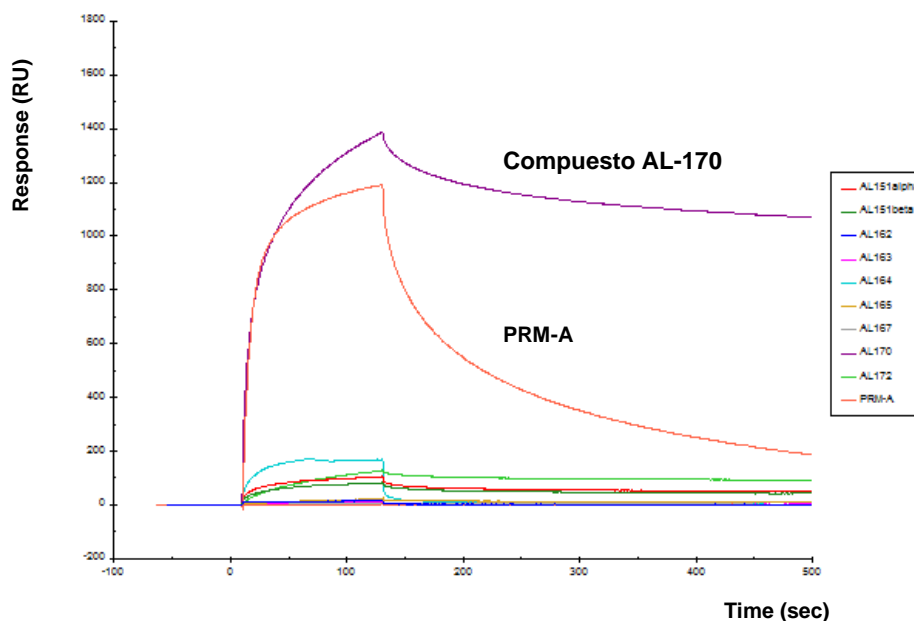


Figura 4. Sensorgrama correspondiente al compuesto AL-170

Para poder determinar si realmente existe interacción entre el compuesto **AL-170** y la glicoproteína gp120, se diseñó el experimento “inverso” en el que el compuesto se ancla sobre el chip y se inyecta la glicoproteína gp120.²⁷ Con este propósito, se preparó el compuesto **42** (Esquema 11, página 45), análogo del compuesto **AL-170**, que incorpora un espaciador funcionalizado con un grupo amino terminal para permitir su unión al chip de forma covalente. Este espaciador se incorporó en uno de los “brazos” del esqueleto del trietilbenceno en base a los estudios de modelización molecular llevados a cabo en nuestro grupo con anterioridad.^{1c} En ellos se observaba que en la cavidad formada por los tres “brazos” del esqueleto de trietilbenceno uno de ellos parecía no establecer ninguna interacción con la manosa cuando dicho azúcar ocupa esa cavidad, por lo que pensamos que se podría prescindir de él. El espaciador elegido presenta un resto de polietilenglicol (PEG) (Esquema 11), suficientemente largo para dotar a **AL-170** de suficiente flexibilidad una vez que se encuentre anclado al chip.

La eficacia de dicho espaciador para inmovilizar carbohidratos en superficies de oro, habría sido previamente demostrada en la literatura.^{20b}

A continuación, **42** se fijó en la superficie del chip sensor a través de un enlace amida de forma similar a la empleada para la inmovilización covalente de proteínas.²⁸ Concretamente, la superficie del chip fue activada con una mezcla 1:1 de NHS-EDC, lo que condujo a la formación de ésteres de N-hidroxisuccinimida, que posteriormente reaccionaron de forma espontánea con el grupo amino libre que presenta en su estructura el compuesto **42** formándose un enlace amida. De esta manera, se inmovilizaron 4566 RUs de **42** sobre la superficie del chip sensor. A continuación, se inyectó la glicoproteína gp120 y la albúmina de suero bovino (BSA) (una proteína que no presenta carbohidratos en su superficie empleada como control negativo) como muestra la figura 5.

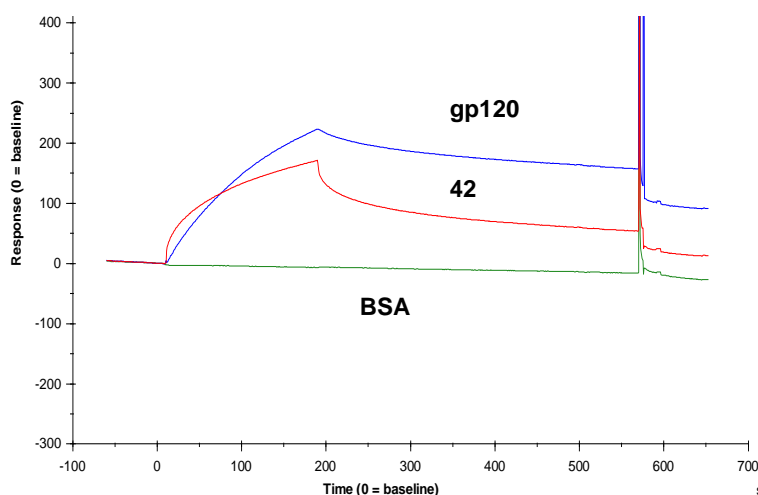


Figura 5. Sensorgrama correspondiente al compuesto 42

La señal de unión relativamente débil (250 RU, figura 5) observada tras la inyección de gp120 en este experimento contrasta con la fuerte señal observada en el experimento “directo” tras la inyección de **AL-170** (1.400 RU, Figura 4). Sin embargo, se observó una vez más que la velocidad de disociación era bastante lenta en comparación con la velocidad de asociación, por lo que no fue posible determinar la constante de asociación (K_D).

Con el fin de conocer el tipo de interacción que el compuesto **AL-170** establece con gp120 y determinar si se une a los carbohidratos o a la parte proteica de la glicoproteína gp120; se inyectó a través de la superficie del chip sensor (curva verde) una proteína que no estuviera glicosilada; en este caso, la proteína elegida fue albúmina de suero bovino (BSA), clásicamente utilizada en este tipo de estudios. La curva de color verde de la Figura 3 indica

que no existe unión del compuesto **42** a BSA. Este resultado indica que **AL-170** podría interaccionar de una manera bastante específica con los carbohidratos de la glicoproteína gp120 del VIH. Por otra parte, se observó que **42** también se une a sí mismo (curva roja). Este resultado estaría de acuerdo con el resultado observado en el experimento “directo” en el que se observa auto-agregación de **42**.

Como hemos mencionado con anterioridad, la glicoproteína gp120 es rica en residuos de manosa y de un modo similar a lo que ocurre para las lectinas, los miméticos de lectinas como pradimicina A (o su análogo soluble pradimicina S) son capaces de unirse a los glicanos ricos en manosa²⁹ presentes en la superficie de gp120. Así, en experimentos de competición llevados a cabo mediante SPR, la inyección de trímeros de manosa junto a pradimicina S hace que la interacción de dicho compuesto con gp120 disminuya.³⁰ En base a ello y con el fin de profundizar en el modo de interacción del compuesto **AL-170** con gp120, se realizaron experimentos de competición similares.

En concreto se realizaron experimentos de SPR en presencia de los trímeros de manosa: (α -1,2)-manotriosa y (α -1,3)(α -1,6)-manotriosa similares a los presentes en la glicoproteína gp120. Para llevar a cabo estos experimentos, los dos trisacáridos se utilizaron en concentraciones de 100 y 400 μ M. Como se puede observar en la figura 6, la presencia de los dos trisacáridos influye en la capacidad de unión, observándose una disminución de la interacción de **AL-170** con gp120 para ambas concentraciones; esta disminución podría sugerir que existe interacción con los trímeros de manosa empleados y que por tanto **AL-170** podría interaccionar con glicanos de manosa similares presentes en gp120.

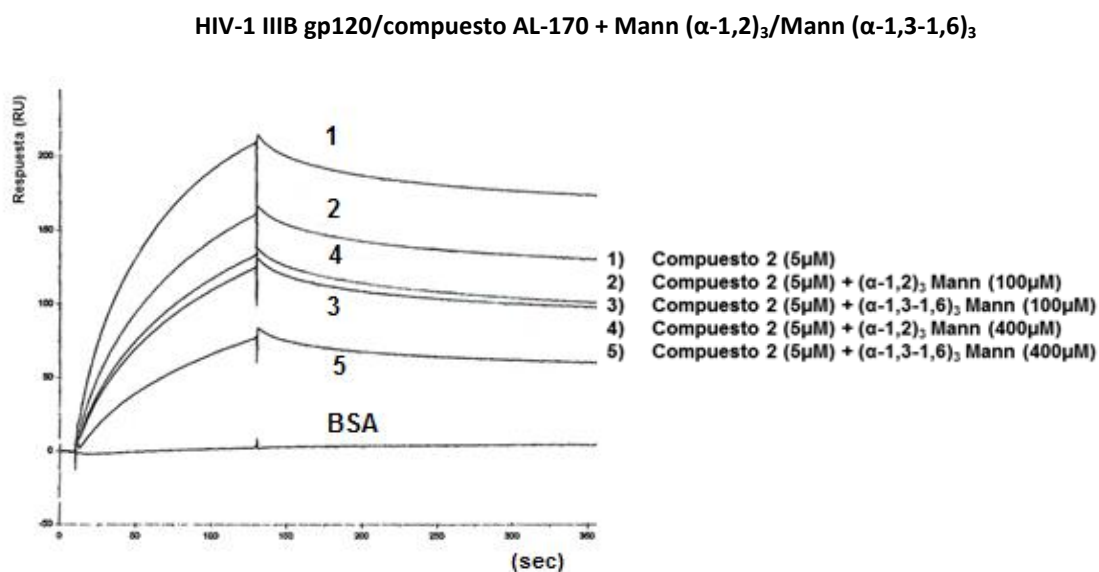


Figura 6. Experimentos de competición del compuesto AL-170 con trisacáridos de manosa

Una vez determinada la capacidad de unión del compuesto **AL-170** a la gp120, a continuación se llevó a cabo la determinación de su capacidad antioxidante tal y como nos planteamos en los objetivos.

Determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos 1, AL-170, 6, 8 y 16

Los radicales libres son especies químicas que contienen en su estructura uno o más electrones desapareados y, por tanto están dotadas de propiedades paramagnéticas que las convierte en compuestos altamente inestables y de gran reactividad, que tienen necesidad de ceder o tomar un electrón de una estructura molecular adyacente con la finalidad de estabilizarse.³¹

Los radicales libres pueden generarse endógenamente, como intermediarios metabólicos o exógenamente en respuesta a agentes externos.³² Entre los factores endógenos se encuentran, entre otros, la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y entre los externos, factores nutricionales, farmacológicos y ambientales como el humo, luz solar, radiaciones electromagnéticas, etc.

El organismo se protege de la acción constante de los radicales libres mediante un complejo sistema de defensa antioxidante. Mientras exista un balance adecuado entre

oxidantes y antioxidantes, el organismo mantiene su funcionamiento celular normal; en caso de existir un predominio oxidativo, el equilibrio se altera dando como resultado el estrés oxidativo que dañará a todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN.

Cada día existen más evidencias de que el estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades como: cáncer, enfermedades cardiovasculares y degenerativas, Parkinson, Alzheimer, entre otras, y también en el envejecimiento.

Por esta razón, el suministro exógeno de antioxidantes, capaces de neutralizar o eliminar los radicales libres, podría representar una estrategia importante para el tratamiento de este tipo de enfermedades.

Los polifenoles, junto al ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E y carotenoides constituyen una de las familias de antioxidantes naturales más importantes presentes en la dieta.

Los polifenoles son bio-sintetizadas por las plantas superiores como una estrategia de defensa contra múltiples patógenos: virus, bacterias, hongos y en respuesta a diferentes situaciones de estrés ambiental. Desde un punto de vista químico todos los polifenoles presentan uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, es decir presentan algún grupo fenólico. Su estructura puede variar desde moléculas sencillas, como es el caso de los ácidos fenólicos, hasta compuestos con alto grado de polimerización.³³

El consumo de alimentos ricos en polifenoles, como son ciertas frutas, verduras, legumbres y cereales se asocia a diversos beneficios para la salud. De hecho cada día son más las publicaciones que revelan que el consumo de productos ricos en polifenoles como el cacao (chocolate negro/amargo), el té verde o el vino tinto (de forma moderada) conlleva efectos favorables para la salud en general y la cardiovascular en particular.

Entre las características más importantes de los polifenoles presentes en los alimentos, destacan sus propiedades antioxidantes.³⁴ Estas propiedades antioxidantes son una de las principales responsables de sus efectos saludables, previniendo enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurodegenerativos.³⁵

La capacidad de los polifenoles para actuar como antioxidantes depende fundamentalmente de los grupos hidroxilo (OH) presentes en su estructura. Al estar unidos a

un anillo bencénico dichos grupos hidroxilo confieren al polifenol la capacidad para neutralizar radicales libres mediante la donación de hidrógeno (HAT) o electrones (SET). En el caso de la donación de un átomo de hidrógeno, el radical fenoxilo (A) formado puede deslocalizarse a lo largo de la estructura (Figura 7).

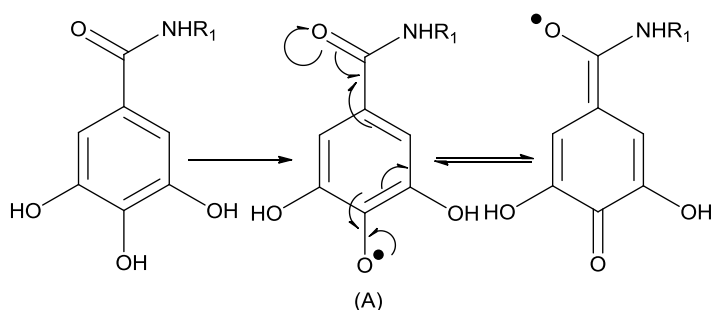


Figura 7. Estabilización del radical fenoxilo mediante la deslocalización de un electrón

Además, algunos polifenoles que presentan hidroxilos catecólicos (orto-dihidroxi) en su estructura, como la quercetina (Figura 8) pueden actuar como antioxidantes a través de un mecanismo de quelación de ciertos metales de transición (como cobre y hierro). Tal reacción evita la formación de radicales libres hidroxilo en la reacción de Fenton (una mezcla de peróxido de hidrógeno y una sal de hierro (II) en solución acuosa)³⁶ y superóxido (a partir de oxígeno molecular) cuya formación es catalizada por dichos metales cuando están en su estado libre o reducido (es decir redox activos).

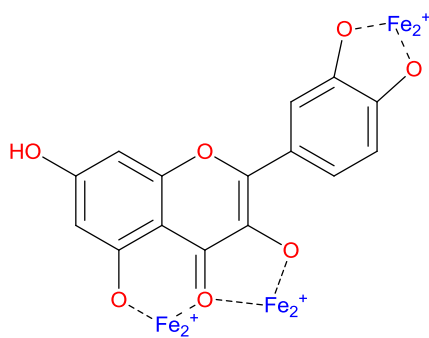


Figura 8. Tres posibles posiciones de quelación de metales presentes en la quercetina

Dado los efectos beneficiosos para la salud de los antioxidantes, en los últimos años ha crecido el interés en la búsqueda de moléculas naturales o sintéticas con este tipo de actividad. Entre las moléculas sintéticas con propiedades antioxidantes de interés destacan los ésteres de ácido galico (3,4,5-trihidroxibenzoico) o alquil galatos. Dentro de esta familia, compuestos

como el propil galato (Figura 9) son usados desde hace tiempo como aditivos antioxidantes en la industria alimentaria.³⁷

En base a todo ello y dado que en el presente capítulo se describe la preparación de varios compuestos con grupos fenólicos en su estructura, consideramos de interés el estudio de sus propiedades antioxidantes y la comparación con compuestos de reconocida capacidad antioxidante como el hidroxitirosol, un derivado fenólico presente en el aceite, o el galato de epigallocatequina, un compuesto fenólico muy abundante en el té verde (Figura 9).

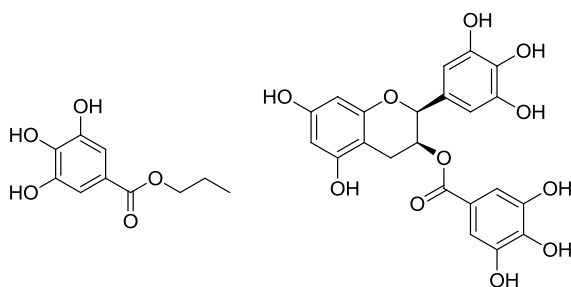


Figura 9. Propil galato y galato de epigallocatequina (EGCG)

Métodos para determinar la capacidad antioxidante de los polifenoles

Debido a la variedad de agentes oxidantes y de los diferentes mecanismos antioxidantes, en la actualidad no existe un sólo método de medida para evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto o alimento lo cual hace necesario el aplicar diferentes ensayos con esta finalidad.³⁸

A grandes rasgos los métodos empleados para determinar la capacidad antioxidante se pueden clasificar en métodos químicos que miden la capacidad de un compuesto para estabilizar o neutralizar un radical libre generado químicamente y métodos biológicos en los que se cuantifica la capacidad de los antioxidantes para inhibir el daño generado por un radical libre en una biomolécula.

A su vez, los métodos químicos más comúnmente empleados para llevar a cabo la determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto se dividen en dos grandes grupos atendiendo principalmente a la reacción química involucrada en el proceso. Así, se puede hablar de ensayos basados en reacciones de transferencia de un electrón (ET) y en reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT).³⁹

En los ensayos de transferencia de un electrón (ET) tiene lugar una reacción redox en la que un compuesto oxidante sufre un cambio de color debido a la reducción que sufre al captar un electrón del antioxidante (polifenol). El cambio de color que experimenta se correlaciona con la concentración del antioxidante, en nuestro caso polifenol. Dentro de este grupo podemos destacar ensayos como: TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), CUPRAC (Copper Reduction), ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) y DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity). En estos ensayos un factor muy importante a tener en cuenta es el pH del medio. Mientras que la capacidad de reducción disminuye en condiciones ácidas como consecuencia de la protonación del antioxidante, en condiciones básicas aumenta debido a la disociación del protón de los compuestos fenólicos.⁴⁰

Por otra parte, los ensayos de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) miden la capacidad de un compuesto antioxidante para neutralizar o captar ("to quench") radicales libres (generalmente radicales peroxilo) generados a través de la descomposición de azocompuestos.⁴¹ Dentro de este grupo se incluyen los ensayos TRAP (Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter) y ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).⁴²

Para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos descritos en el presente capítulo se han empleado los métodos químicos ABTS y ORAC, basados en la captación de radicales libres, y el método FRAP, basado en la transferencia de electrones según procedimientos optimizados por el grupo de investigación del ICTAN. Las características más importantes de dichos métodos se describen a continuación:

ABTS

El ensayo ABTS fue descrito por Miller y Rice-Evans (1993) y está basado en la capacidad antioxidante de la muestra problema para reducir el radical ABTS^{•+}, de color azul verdoso, a la forma incolora ABTS (Figura 10).

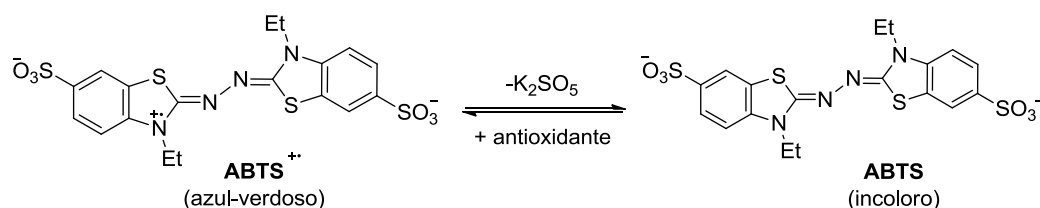


Figura 10. Reacción de oxidación del ABTS

Como patrón se emplea el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico (Trolox), un análogo sintético hidrosoluble del tocoferol o de la vitamina E (Figura 11) comercializado por la compañía Hoffman-LaRoche como Trolox[®]. Han sido varias las modificaciones realizadas sobre el método original que se han centrado en el modo de generar el radical, usándose reacciones enzimáticas,⁴³ dióxido de manganeso⁴⁴ o persulfato potásico.⁴⁵

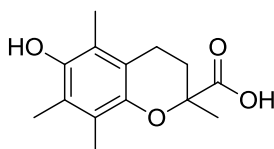


Figura 11. Estructura del Trolox[®]

FRAP

Este método fue desarrollado por Benzie y Strain (1996) para medir el poder reductor del plasma, y posteriormente ha sido adaptado para el análisis de la capacidad antioxidante en alimentos. El mecanismo básico de reacción es la transferencia de electrones (SET). El método determina la capacidad de la muestra para reducir un complejo de hierro férrico (Fe^{3+}) con la molécula TPTZ (ferric 2,4,6-tripyridyl-S-triazine) a su forma ferrosa (Fe^{2+}), dando un compuesto coloreado que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 595 nm (Figura 12).

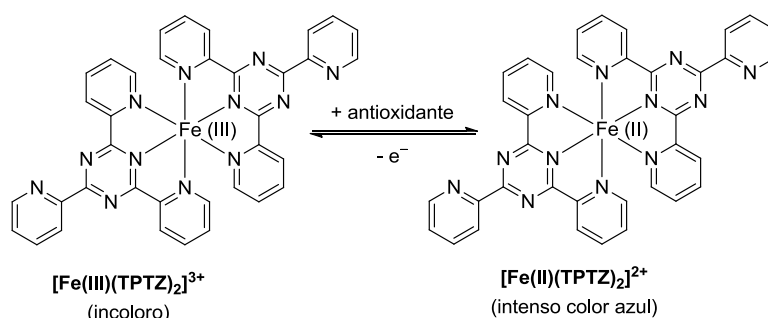


Figura 12. Reacción de oxidación del complejo [Fe(III)(TPTZ)₂]³⁺

ORAC

El ensayo ORAC mide la degradación oxidativa de una molécula fluorescente como la fluoresceína sometida a un flujo constante de radicales peroxilo (ROO^\bullet) generados por un azocompuesto, 2,2'-azobis(2-amidino-propano)dichlorhidrato (AAPH). La protección ejercida por los antioxidantes se cuantifica a través de la fluorescencia.⁴⁶ Como patrón se emplea Trolox®.

Evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos 1, AL-170, 6, 8 y 16

Aunque el objetivo inicial era determinar la capacidad antioxidante de **AL-170**, decidimos extender nuestro estudio a otros compuestos fenólicos (**1**, **6**, **8** y **16**) descritos en la presente memoria. Para la evaluación de las propiedades antioxidantes de dichos compuestos, se empleó un método basado en la transferencia de electrones (FRAP) y dos métodos basados en la captación de radicales libres (ABTS y ORAC). Este trabajo se realizó en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) bajo la supervisión de las Dras. Raquel Mateos y Laura Bravo durante una estancia predoctoral en ese centro, según procedimientos optimizados por dicho grupo.

En la Tabla 2 se recogen los datos obtenidos para los compuestos descritos en la presente Tesis Doctoral.

Tabla 2. Determinación de la capacidad antioxidante mediante los métodos FRAP, ABTS y ORAC de los compuestos **1**, **AL-170**, **6**, **8** y **16**.

Compuestos	FRAP (mM ET)	ABTS (mM ET)	ORAC (mM ET)
1	4.62 ± 0.19 ^a	4.93 ± 0.21 ^b	3.03 ± 0.10 ^b
AL-170	3.86 ± 0.14 ^c	3.48 ± 0.15 ^c	2.89 ± 0.09 ^b
6	No se detecta	No se detecta	No se detecta
8	1.87 ± 0.08 ^e	3.19 ± 0.13 ^d	2.80 ± 0.09 ^{b,c}
16	3.45 ± 0.15 ^d	2.34 ± 0.10 ^e	2.69 ± 0.08 ^c
Galato de epigallocatequina	4.18 ± 0.16 ^b	7.95 ± 0.34 ^a	3.47 ± 0.11 ^a
Hidroxitiroso	1.39 ± 0.15 ^{b,c}	0.84 ± 0.02 ^c	1.92 ± 0.04

Los resultados representan la media ± desviación estándar de cuatro determinaciones y se expresan como equivalentes de Trolox (ET, mM). Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos se expresan como equivalentes de Trolox (ET), que es el patrón empleado como referencia.

En primer lugar, merece la pena destacar que todos los compuestos, a excepción del compuesto **6** que no mostró ninguna capacidad antioxidante, mostraron capacidad antioxidante, siendo ésta mayor que la de los estándares utilizados como referencia, Trolox (Figura 11, página 62) e hidroxitirosol (Figura 13).

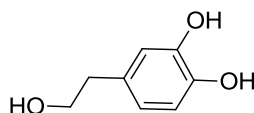


Figura 13. Estructura del hidroxitirosol

Todos los compuestos estudiados poseen un esqueleto central de trietilbenceno sustituido con tres anillos fenólicos bien con tres grupos hidroxilo (**1** y **AL-170**) o bien con dos grupos hidroxilo (**6**, **8** y **16**). A excepción de **6**, se observó mayor potencia antioxidante para los compuestos que poseen anillos aromáticos con 3 grupos hidroxilo (**1** y **AL-170**) que para los que poseen dos grupos hidroxilo en cada anillo aromático (**8** y **16**).

Con respecto a la influencia que la posición de los grupos hidroxilos tiene en la capacidad antioxidante, se observa en todos los ensayos que el anillo de galatilo con los OHs situados en las posiciones 3, 4 y 5 del anillo aromático, compuesto **1**, proporciona mayor capacidad antioxidante que su isómero que contiene los OHs en las posiciones 2, 3 y 4, compuesto **AL-170**. A su vez, el compuesto **1**, con tres grupos galatilo, mostró en el ensayo FRAP mayor poder antioxidante que el galato de epigallocatequina, con dos grupos galatilo. Sin embargo, la capacidad antioxidante determinada mediante los ensayos ABTS y ORAC revelaron que el galato de epigallocatequina posee mejor actividad de captación de radicales libres que **1**, siendo el mejor de todos los compuestos evaluados.

Por otra parte, los compuestos **8** y **16**, con dos grupos OH en el anillo aromático, mostraron distinto comportamiento en función del método de análisis utilizado. Así, según el método FRAP, el compuesto **16**, con tres residuos de 3,4-dihidroxifeniletilo, posee un mayor poder reductor que el compuesto **8**, sustituido con tres residuos de 2,3-dihidroxifenilo. Sin embargo, estos compuestos mostraron una tendencia contraria en ambos ensayos de captación de radicales libres (ABTS y ORAC), siendo **8** más activo que **16**. Con respecto a **16**,

en cuyo diseño se tuvo en cuenta la estructura del hidroxitirosol (Figura 13), presente en el aceite de oliva, merece la pena destacar que posee mayor capacidad antioxidante que éste.

Por último, el compuesto **6**, con un esqueleto central de trietilbenceno sustituido con 3 anillos aromáticos con los grupos OH no contiguos (posición 2 y 4) no mostró carácter antioxidante, poniendo de manifiesto la importancia de la posición de los grupos hidroxilos en el anillo aromático, y más en concreto, de que los OHs fenólicos ocupen posiciones contiguas.

En conclusión, los compuestos de trietilbenceno sustituidos con tres anillos fenólicos con 2 ó 3 grupos hidroxilo en posiciones contiguas, proporcionan una potencia antioxidante relacionada con el número y posición los OHs fenólicos, pudiendo alcanzar alguno de los compuestos sintetizados valores de capacidad antioxidante similares a los del galato de epigallocatequina, un polifenol natural presente en nuestra dieta.

El compuesto **1** sustituido con grupos galatilo es el que muestra mayor poder antioxidante. En la actualidad se está estudiando la actividad antibacteriana y antiviral de dichos compuestos.

CONCLUSIONES

A partir del compuesto **AL-170**¹, descubierto en nuestro grupo de trabajo y con el fin de encontrar nuevos compuestos capaces de interactuar con los azúcares presentes en la superficie de gp120, se ha preparado una familia de compuestos con un anillo central de trietilbenceno y diferentes grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno en la periferia.

En general, la preparación de dichos compuestos se ha llevado a cabo por acoplamiento de una triamina derivada de trietilbenceno (1,3,5-trisamina-2,4,6-trietilbenceno) con el correspondiente ácido carboxílico. Para el caso de los ácidos di- o trihidroxibenzoicos fue necesaria la protección de los OHs fenólicos como éteres metílicos o bencílicos y la siguiente desprotección empleando Br₃B o hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C.

Los datos de actividad anti-VIH encontrados revelaron que:

El número de OHs presentes en el anillo aromático, así como su posición parecen importantes en la actividad, resultando tan sólo activo el compuesto **AL-170** sustituido con tres anillos de 2, 3, 4-trihidroxibenzoilo. Sus correspondientes isómeros con los tres OHs en posiciones 3, 4, 5 o 2, 4, 6 conducen a compuestos inactivos. También lo fueron los compuestos con tan solo 2 OHs en el anillo aromático.

La separación entre el esqueleto central y los residuos fenólicos no contribuye a mejorar la actividad. Así, compuestos con distintos espaciadores (2 y 4 metilenos y piperazina) entre el anillo fenólico y el esqueleto central no mostraron actividad.

Asimismo, un aumento en el número de residuos fenólicos (6 frente a 3) unidos al esqueleto central conduce a una pérdida de actividad.

La pérdida de aromaticidad o la sustitución de los anillos fenólicos por otros anillos con capacidad para formar enlaces de hidrógeno y establecer interacciones CH- π , tales como: pirrol, aminopiridina, anilina, etc., conduce a la pérdida de la actividad.

Mediante experimentos SPR se ha estudiado la capacidad de un nuevo lote de **AL-170** para interactuar con la glicoproteína gp120 situada en la superficie del VIH. Para ello, se llevó a cabo en primer lugar un experimento “directo” (anclando la glicoproteína gp120 al chip) que mostró una unión muy significativa del compuesto **AL-170**, siendo ésta incluso mayor que la observada para la pradimicina-A, compuesto empleado como referencia. Sin embargo,

mientras que la velocidad de asociación de **AL-170** a gp120 es del mismo orden de magnitud que la de la pradimicina-A; la velocidad de disociación es mucho más lenta, lo que podría deberse a fenómenos de autoagregación y resultó difícil la regeneración del chip, por lo que no fue posible determinar la constante de afinidad (K_D).

Además, se llevó a cabo el experimento “inverso” (en el que el compuesto **AL-170** se ancló al chip) que parece indicar que el compuesto **AL-170** establece una interacción específica con gp120. Por último, se realizaron estudios de competición empleando trómeros de manosa similares a los presentes en la superficie de la glicoproteína gp120. Los resultados indican que existe interacción con los trómeros de manosa empleados y que por tanto **AL-170** podría interaccionar con los glicanos de manosa similares presentes en gp120.

Por último, se realizaron ensayos “*in vitro*” de las propiedades antioxidantes de **AL-170** y otros compuestos fenólicos preparados, empleando los métodos: FRAP, ORAC y ABTS. Los datos obtenidos en estos ensayos revelaron que todos los compuestos estudiados, excepto **6**, presentan una capacidad antioxidante superior a la del compuesto de referencia (Trolox®).

La capacidad antioxidante de nuestros compuestos viene determinada por su estructura química, y más concretamente, por el número y la posición de los grupos hidroxilos respecto al grupo carboxilo.⁴⁵ En primer lugar, la actividad antioxidante aumenta a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo. Así por ejemplo, los compuestos **1** y **AL-170**, que poseen tres grupos hidroxilo muestran una mayor capacidad antioxidante que **8** y **16**, con dos grupos hidroxilo.

El grupo galilo (3, 4, 5-trihidroxifenilo) confiere mayor capacidad antioxidante que su isómero 2, 3, 4-trihidroxifenilo. La presencia de al menos dos grupos hidroxilos contiguos es crucial para la capacidad antioxidante, tal y como lo demuestra el hecho de que **6** con dos grupos OH no contiguos no posea capacidad antioxidante alguna.

.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de los compuestos de partida

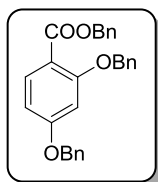
Método general para la bencilación de ácidos benzoicos

A una disolución del correspondiente ácido benzoico comercial (1 eq) en acetona anhidra (100 mL) se le añade K_2CO_3 (5 eq en el caso de 3 grupos OH o 4 eq en el caso de 2 grupos OH), bromuro de bencilo (5 eq en el caso de 3 grupos OH o 4 eq en el caso de 2 grupos OH) y NaI (1 eq). La disolución se agita a reflujo durante toda la noche y el disolvente se evapora a sequedad. Seguidamente se añade agua (200 mL) y se extrae la mezcla con AcOEt (3 x 100 mL). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a sequedad. El residuo se cristaliza de etanol.

Método general para la saponificación de ésteres bencilicos.

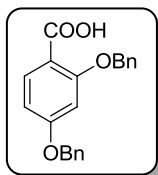
El correspondiente derivado bencilado se disuelve en una disolución de KOH (3 N) en metanol (100 mL). La disolución se calienta a reflujo durante 12 horas y se acidifica a temperatura ambiente hasta pH 3-4 con una disolución 3 N de HCl. El precipitado blanco resultante se filtra y se redisuelve en acetato de etilo (80 mL) lavándose con agua (3 x 60 mL). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a sequedad. En cada caso se indican las condiciones empleadas para la purificación.

2,4-Dibenciloxibenzoato de bencilo⁴⁸



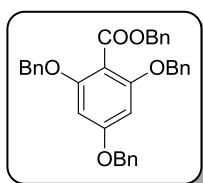
El ácido 2,4-dihidroxibenzoico comercial (2 g, 12.9 mmol), K_2CO_3 (7.13 g, 52 mmol), bromuro de bencilo (6.17 mL, 52 mmol) y NaI (1.94 g, 12.9 mmol) se hacen reaccionar según el método general para la bencilación de ácidos benzoicos, obteniéndose 3.95 g (67%) de 2,4-dibenciloxibenzoato de bencilo como un sólido blanco. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la bibliografía.

Ácido 2,4-dibenciloxibenzoico⁴



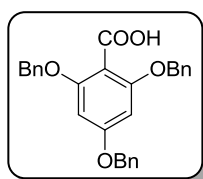
El compuesto anterior (3.95 g, 9.3 mmol) se saponifica según el método general. El residuo se recrystaliza de metanol, aislándose 2.05 g (65%) de ácido 2,4-dibenciloxibenzoico como un sólido blanco. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la bibliografía.

2,4,6-Tribenciloxibenzoato de bencilo⁸



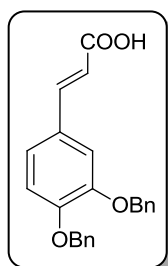
El ácido comercial 2,4,6-trihidroxibenzoico monohidratado (2 g, 10.6 mmol), K_2CO_3 (7.33 g, 53 mmol), bromuro de bencilo (6.33 mL, 53 mmol) y NaI (1.59 g, 10.6 mmol) se hacen reaccionar según el método general para la bencilación de ácidos benzoicos, obteniéndose 2.33 g (67%) de 2,4,6-tribenciloxibenzoato de bencilo como un sólido amarillo. Los datos de RMN en acetona- d_6 están descritos en la literatura mientras que en $CDCl_3$ se describen a continuación; 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.98 (s, 2H, CH_2Ar), 5.05 (s, 4H, CH_2Ar), 5.31 (s, 2H, CH_2Ar), 6.22 (s, 2H, Ar), 7.36 (m, 20H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 67.34 (CH_2), 70.67 (CH_2), 70.96 (CH_2), 93.92 (CH, C), 127.50 (CH), 127.85 (CH), 128.24-129.05 (CH), 136.46 (C), 136.75 (C), 136.98 (C), 158.13 (C), 161.82 (C), 166.53 (C=O).

Ácido 2,4,6-tribenciloxibenzoico⁸



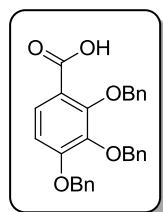
El compuesto anterior (2.33 g, 4.40 mmol) se saponifica siguiendo el método general. El residuo se recrystaliza en metanol, aislándose 936 mg (56%) de ácido 2,4,6-tribenciloxibenzoico como un sólido amarillo. Los datos de RMN en acetona- d_6 están descritos en la literatura mientras que en $CDCl_3$ se describen a continuación; 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.01 (s, 2H, CH_2Ar), 5.13 (s, 4H, CH_2Ar), 6.28 (s, 2H, Ar), 7.36 (m, 15H, Ar). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 70.23 (CH_2), 71.80 (CH_2), 94.33 (CH, C), 127.56 (CH), 127.91 (CH), 128.58-129.16 (CH), 136.23 (C), 160.04 (C), 162.82 (C), 164.99 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 9.74 min. Análisis elemental (%) teórico para $C_{28}H_{24}O_5$: C, 76.35; H, 5.49. Hallado C, 76.38; H, 5.26.

Ácido dibenciloxicafeico¹²



El ácido cafeico comercial (2 g, 11.1 mmol), K_2CO_3 (6.14 g, 44.4 mmol), bromuro de bencilo (5.29 mL, 44.4 mmol) y NaI (1.66 g, 11.1 mmol) se hacen reaccionar según el método general para la bencilación de ácidos benzoicos, obteniéndose 4.23 g (85%) de un sólido amarillo que se saponifica siguiendo el método general. El residuo se recrystaliza en etanol, aislándose 2.76 g (69%) de ácido dibenciloxicafeico como un sólido blanco. Los datos de RMN en $CDCl_3$ están descritos en la literatura mientras que en metanol- d_4 se describen a continuación; 1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ : 4.51 (s, 4H, CH_2Ar), 6.21 (m, 1H, $CH=CH$), 6.94 (m, 1H, Ar), 7.09 (m, 1H, Ar), 7.14 (m, 1H, $CH=CH$), 7.39 (m, 10H, Ar), 7.56 (m, 1H, Ar). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 9.29 min. Análisis elemental (%) teórico para $C_{23}H_{20}O_4$: C, 76.65; H, 5.59; N. Hallado: C, 76.48; H, 5.60.

Ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico⁷



El ácido comercial 2,3,4-trihidroxibenzoico (5 g, 29.39 mmol), K_2CO_3 (20.30 g, 146.95 mmol), bromuro de bencilo (16 mL, 146.95 mmol) y NaI (4.4 g, 29.39 mmol) se hacen reaccionar según el método general para la bencilación de ácidos benzoicos, obteniéndose 12.7 g (81%) de 2,3,4-tribenciloxibenzoato de bencilo como un sólido blanco. El compuesto anterior (7.2 g, 13.56 mmol) se saponifica siguiendo el método general. El residuo se recrystaliza en metanol, aislándose 5.8 g (97%) de **17** como un sólido blanco. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la bibliografía.

Síntesis de compuestos basados en esqueleto de trietilbenceno

Método general A para la reacción de la triamina **4³ con ácidos benzoicos.**

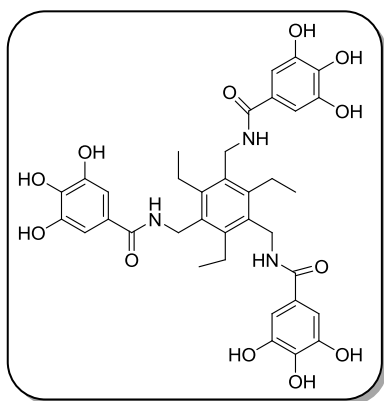
A una disolución del correspondiente ácido benzoico en DCM seco (1-5 mL) o DMF seca (20 mL) se le añade PyBOP (3.6 eq). Pasados 5 minutos, a la mezcla de reacción se le añade la triamina **4** (1 eq) y trietilamina (3.6 eq). La mezcla se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y el disolvente se evapora a sequedad. El crudo de reacción se lava sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (3 x 30 mL), disolución saturada de

NaHCO₃ (3 x 30 mL) y NaCl (1 x 30 mL). La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), filtra y evapora a sequedad. En cada caso se indican las condiciones empleadas para purificar el residuo resultante.

Método general B para la desprotección de los éteres bencilicos

En un matraz, se introduce el correspondiente derivado bencilado (1 mmol) disuelto en THF/metanol (1:1, 20 mL). Al matraz se le añade Pd/C (30%) y se cierra con un septum de goma. Tras realizar vacío, se introduce en el septum una aguja conectada a un globo lleno de hidrógeno mediante un tubo de goma (se suele emplear un globo de paredes gruesas o un globo triple, introduciendo un globo dentro del otro).⁴⁹ La disolución se hidrogena a 30 °C y presión atmosférica durante la noche. A continuación se filtra el catalizador sobre filtro Whatman® 42, se lava con metanol y el filtrado se evapora a sequedad para dar lugar al correspondiente derivado desprotegido. En cada caso se indican las condiciones empleadas para purificar el residuo resultante.

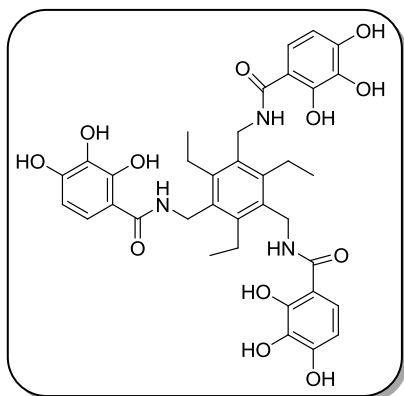
1,3,5-Tris(3,4,5-trihidroxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (1)¹



El ácido 3,4,5-tribenciloxibenzoico⁶ (317 mg, 0.72 mmol) y la triamina **4** (50 mg, 0.2 mmol) se hacen reaccionar siguiendo el método general A. El residuo resultante se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol 9:1) obteniéndose 212 mg (70%) de 1,3,5-tris(3,4,5-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno **9** como un sólido blanco.¹ El compuesto anterior (100 mg, 0.066 mmol)

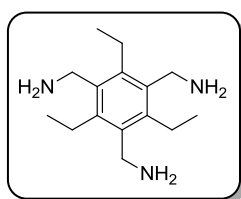
se desprotege según el método general B obteniendo 47 mg (99%) de **1** como un sólido blanco. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la bibliografía.

1,3,5-Tris(2,3,4-trihidroxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (AL-170)¹



El ácido 2,3,4-tribenciloxibenzoico⁷ (317 mg, 0.72 mmol) y la triamina **4**³ (50 mg, mmol) se hacen reaccionar siguiendo el método general A. El residuo resultante se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol 9:1) obteniéndose 190 mg (63%) de 1,3,5-tris(3,4,5-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno **10** como un aceite amarillo.¹ El compuesto anterior (190 mg, 0.12 mmol) se desprotege según el método general B obteniéndose 67 mg (76%) de **AL-170** como un sólido blanco. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la bibliografía.

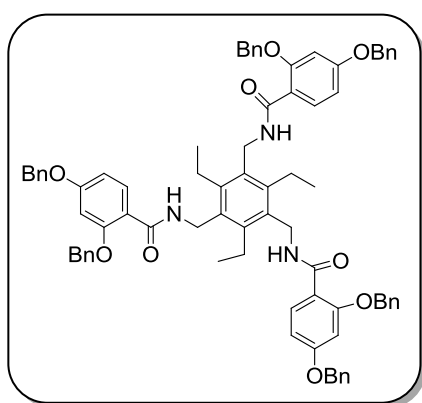
1,3,5-Tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno (**4**)³



A una mezcla de trietilbenceno (1 mL, 5.3 mmol) y paraformaldehído (1.6 g, 55.6 mmol) en HBr/AcOH (30% en peso, 10 mL) se le añade lentamente y a temperatura ambiente bromuro de zinc (2 g, 8.7 mmol). La disolución naranja se deja reaccionar a 90° C durante la noche apareciendo un precipitado en suspensión. La reacción se enfría a temperatura ambiente, el precipitado se filtra, se lava con agua y se seca a vacío durante la noche, para obtener 2.2 g (94%) de 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno **2**³ como un sólido marrón. En un matraz se disuelve el compuesto anterior (461 mg, 1.05 mmol) en DMF (15 mL) y se añade NaN₃ (610 mg, 9.04 mmol). La reacción se calienta a 90° C bajo atmósfera de argón durante la noche. A continuación el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo resultante se disuelve en acetato de etilo (5 mL), se lava con H₂O (3 x 10 mL) y con disolución saturada de NaCl. Las fases orgánicas se evaporan a vacío y el residuo obtenido se recristaliza de acetato de etilo:hexano (25:75) para obtener 315 mg (90%) de 1,3,5-tris(azidometil)-2,4,6-trietilbenceno **3** como un sólido blanco; p.f. 61-63 °C (*lit.* 61 °C)³ ¡PRECAUCION!: la azida sódica (NaN₃) es explosiva en determinadas condiciones y por eso debe manejarse con cautela. A una disolución del compuesto anterior (273 mg, 0.82 mmol) en THF (10 mL) se le añade trifenilfosfina (1.40 g, 5.3 mmol) y agua destilada (0.2 mL). La

disolución se calienta a 30° C durante la noche. A continuación se elimina el disolvente a vacío y el residuo se acidifica (pH = 3), mientras se enfría a 0 °C, con una disolución de HCl al 50% y se lava con DCM. La fase acuosa se basifica, mientras se enfría a 0 °C, con una disolución saturada de NaOH y se lava con DCM. La fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl, se seca, filtra, evapora y liofiliza para obtener 177 mg (83%) de 1,3,5-tris(aminometil)-2,4,6-trietilbenceno (**4**) como un sólido blanco. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la bibliografía.

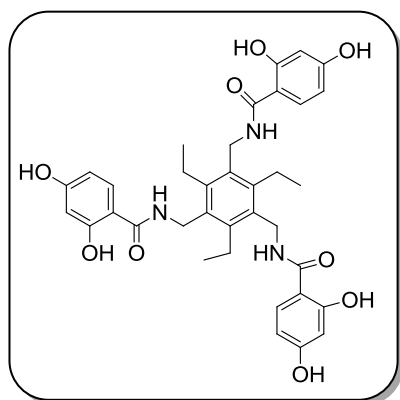
1,3,5-Tris(2,4-dibenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (**5**)



Una disolución en DMF (20 mL) que contiene ácido 2,4-dibenciloxibenzoico (550 mg, 1.6 mmol), triamina **4**³ (100 mg, 0.4 mmol), PyBOP (850 mg, 1.6 mmol) y trietilamina (222 μ L, 1.6 mmol) se hace reaccionar según el método general A para dar un residuo que se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (hexano/AcOEt, 1:1) para obtener 381 mg (80%)

de **5** como un sólido amorfo. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.00 (t, J = 7.3 Hz, 9H, CH₃CH₂), 2.44 (m, 6H, CH₂CH₃), 4.53 (s, 6H, CH₂NH), 4.84 (s, 6H, CH₂Ar), 5.13 (s, 6H, CH₂Ar), 6.60 (d, J = 2.3 Hz, 3H, Ar), 6.75 (dd, J = 2.3 Hz y J = 6.5 Hz, 3H, Ar), 7.02 (m, 15H, Ar), 7.45 (m, 18H, Ar), 8.29 (s, 3H, NH).

1,3,5-Tris(2,4-dihidroxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (**6**)

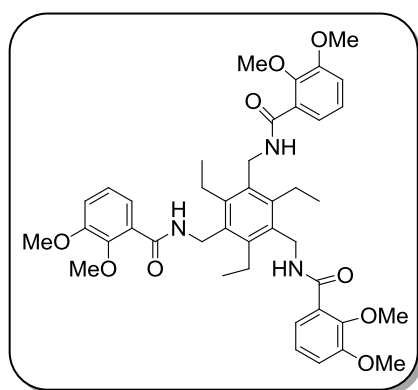


El compuesto **5** (381 mg, 0.32 mmol) se desprotege según el método general B. El filtrado se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (agua/acetonitrilo, 1:1) para obtener 119 mg (45%) de **6** como un sólido blanco; p.f. 301-303 °C. EM (ES, positivo): m/z 680.3 (M+Na)⁺, m/z 658.3 (M+H)⁺. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.11 (t, J = 7.3 Hz, 9H, CH₃), 2.78 (c, J = 7.3

Hz, 6H, CH₂CH₃), 4.54 (s, 6H, CH₂NH), 6.23 (m, 6H, Ar), 7.76 (d, J = 8.7 Hz, 3H, Ar), 8.40 (s, 3H, NH), 9.96 (s_{ancho}, 3H, OH_{para}), 12.43 (s_{ancho}, 3H, OH_{orto}). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ :

21.31 (CH₃), 27.86 (CH₂), 42.51 (CH₂), 107.82 (CH), 112.16 (C), 112.67 (C), 135.39 (CH), 137.12 (CH), 148.99 (CH), 166.55 (C), 167.18 (C), 173.17 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 7.80 min. Análisis elemental (%) teórico para C₃₆H₃₉N₃O₉: C, 65.74; H, 5.98; N, 6.39. Hallado: C, 65,68; H, 6.08; N, 6.14.

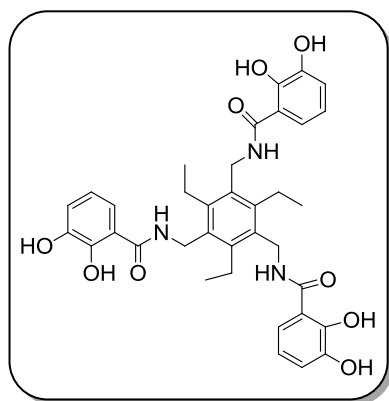
1,3,5-Tris(2,3-dimetoxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (**7**)⁵



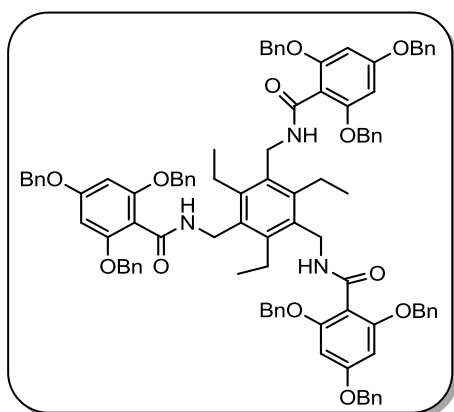
literatura.⁵

El ácido comercial 2,3-dimetoxibenzoico (120 mg, 0.66 mmol) y la triamina **4**³ (50 mg, 0.2 mmol) se hacen reaccionar según el método general A. El residuo resultante se purifica mediante CCTLC en un cromatotrón (DCM/metanol, 1:1) para obtener 84 mg (57%) de un sólido blanco (**7**) cuyos datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los de la

1,3,5-Tris(2,3-dihidroxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (**8**)⁵

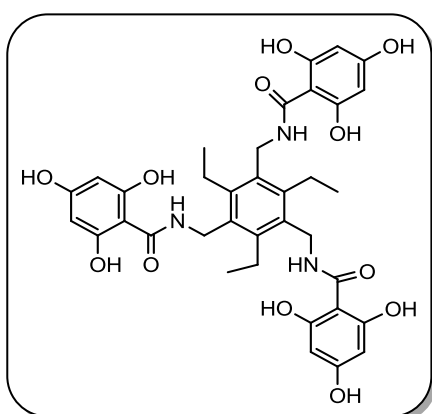


Una disolución del compuesto **7** (73 mg, 0.097 mmol) en DCM seco (250 mL) se enfría a 0 °C. Lentamente se añade BBr₃ (1.5 eq por cada grupo OMe)⁵ bajo atmósfera de argón y la mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez completada la reacción se adiciona agua fría lentamente para hidrolizar el exceso de reactivo y los complejos de boro formados. La mezcla se evapora a sequedad y se disuelve en metanol; el cual se evapora a presión reducida para eliminar las impurezas de boro. Se llevan a cabo diez ciclos de disolución del residuo en metanol, seguido de eliminación del disolvente a vacío para eliminar todas las impurezas de boro del producto. El residuo se filtra y tritura con DCM y éter fríos para obtener 45 mg (70%) de **8** como un sólido blanco p.f. 238-240 °C. Los datos analíticos y espectroscópicos de dicho compuesto son consistentes con los descritos en la literatura.

1,3,5-Tris(2,4,6-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (11)

A una disolución de ácido 2,4,6-tribenciloxibenzoico (440 mg, 1 mmol) en DMF (20 mL) se le añade la triamina **4**³ (50 mg, 0.2 mmol), HATU (274 mg, 1 mmol), y DIPEA (126 µL, 1 mmol). La mezcla de reacción se calienta durante toda la noche a 95°C y el crudo de reacción se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en DCM (50 mL) y

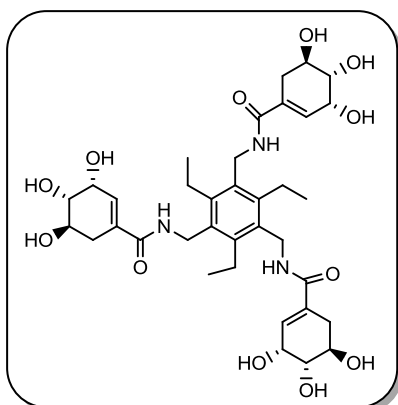
se lava sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (3 x 30 mL). En caso de que aparezcan emulsiones se añade 10 H₂O.NaSO₄ y se agita la mezcla hasta la desaparición de éstas. Seguidamente se lava con disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 30 mL) y NaCl (1 x 30 mL). La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), filtra y evapora a sequedad. El residuo resultante se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (hexano/AcOEt, 1:1) obteniéndose 184 mg (60%) de **11** como un sólido amorfo. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, CH₃CH₂), 2.46 (c, *J* = 7.5 Hz, 6H, CH₂CH₃), 4.49 (s, 6H, CH₂NH), 4.91 (m, 12H, CH₂Ar), 4.95 (m, 6H, CH₂Ar), 6.13 (s, 6H, Ar), 7.23 (m, 30H, Ar), 7.34 (m, 15H, Ar).

1,3,5-Tris(2,4,6-trihidroxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (12)

El compuesto **11** (184 mg, 0.12 mmol) se desprotege siguiendo el método general B. El residuo final se tritura con una mezcla de DCM/éter, obteniéndose 24 mg (32%) de **12** como un sólido blanco; p.f. 301-303 °C. EM (ESI, positivo): *m/z* 706.82 (M+H)⁺. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 1.26 (m, 9H, CH₃CH₂), 2.88 (m, 6H, CH₂CH₃), 4.68 (m, 6H, CH₂NH),

5.49 (m, 3H, Ar), 5.80 (m, 3H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ: 15.87 (CH₃), 22.45 (CH₂), 37.32 (CH₂), 95.60 (CH), 132.40 (C), 144.17 (C), 161.97 (C), 162.41 (C), 170.19 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 6.66 min. Análisis elemental (%) teórico para C₃₆H₃₉N₃O₁₂: C, 61.27; H, 5.57; N, 5.95. Hallado: C, 61,11; H, 5.8; N, 5.86.

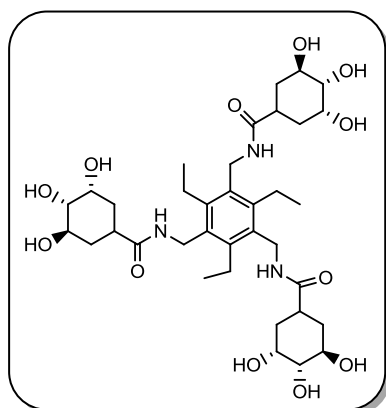
1,3,5-Tris-((3S,4R,5S)-3,4,5-trihidroxiciclohex-1-en-1-il-carbonilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (13)



El ácido siquímico (122 mg, 0.7 mmol), HATU (266 mg, 0.7 mmol), triamina **4**³ (50 mg, 0.2 mmol) y DIPEA (105 μ L, 0.6 mmol) en DMF (20 mL) se hacen reaccionar siguiendo el método general A. El crudo de reacción se concentra y se purifica por trituración con éter para obtener 109 mg (76%) de **13** como un sólido blanco; p.f. 242-244 °C. EM (ESI, positivo): m/z 740.36 ($M+Na$)⁺; m/z 718.43

($M+H$)⁺. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 1.17 (t, 9H, $J = 7.4$ Hz, CH_3CH_2), 2.15 (dd, 3H, $J = 18.0$ Hz, 6.0 Hz, CH_{2A}), 2.75 (m, 9H, CH_{2B} , CH_2CH_3), 3.62 (dd, 3H, $J = 7.5$ Hz, 4.2 Hz, $CHOH$), 3.96 (m, 3H, $CHOH$), 4.30 (m, 3H, $CHOH$) 4.51 (s, 6H, CH_2NH), 6.28 (m, 3H, $CH=CH$). ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ : 16.09 (CH_3), 23.38 (CH_2), 32.01 (CH_2), 39.10 (CH_2), 66.97 (CH), 68.19 (CH), 72.80 (CH), 133.00 (CH), 133.19 (C), 134.68 (C), 146.07 (C), 170.96 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 2-30% de A en 5 min]: 4.93 min. Análisis elemental (%) teórico para C₃₆H₅₁N₃O₁₂: C, 60.24; H, 7.16; N, 5.85. Hallado: C, 60.37; H, 6.87; N, 5.45.

1,3,5-Tris-((3S,4R,5S)-3,4,5-trihidroxiciclohexilcarbonilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (14)

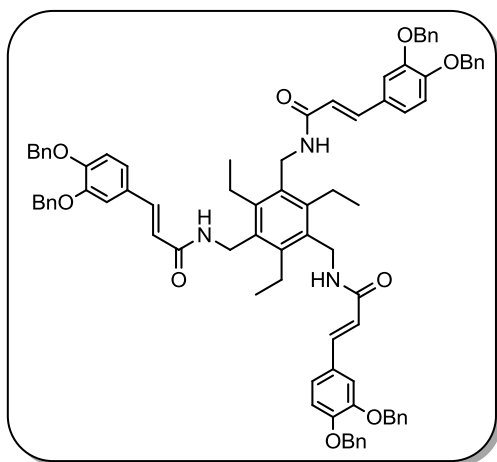


A una disolución de **13** (69 mg, 0.1 mmol) en THF/metanol (1:1) se le añade Pd/C (30%) y se hidrogena a 30 °C y 2.9 atm (42 psi) durante una hora. A continuación se filtra el catalizador sobre filtro Whatman® 42, se lava con metanol y el filtrado se evapora a sequedad. El compuesto se purifica por trituración con una mezcla metanol/éter (1:1), obteniéndose 31 mg (45%) de **14** como un sólido blanco;

p.f. 285-287 °C. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para C₃₆H₅₈N₃O₁₂⁺ ($M+H$)⁺ 724.4020; encontrada 724.4002; m/z calculada para C₃₆H₅₇N₃NaO₁₂⁺ ($M+Na$)⁺ 746.3840; encontrada 746.3805; m/z calculada para C₃₆H₅₇KN₃O₁₂⁺ ($M+K$)⁺ 762.3579; encontrada 762.3511. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 1.15 (m, 9H, CH_3CH_2), 1.59 (m, 3H, CH_A), 1.7 (m, 3H,

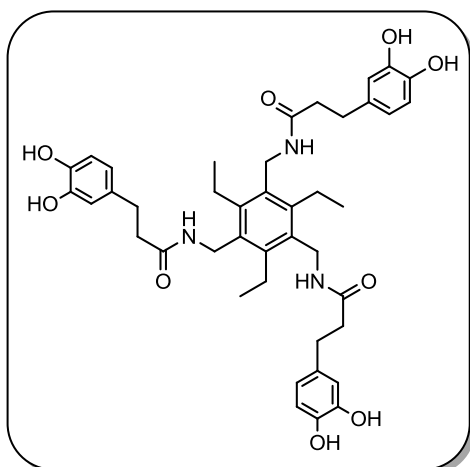
CH_A), 1.88 (m, 3H, CH_B), 1.97 (m, 3H, CH_B), 2.75 (m, 6H, CH₂CH₃), 3.70 (m, 3H, CHOH), 3.86 (m, 3H, CHOH), 3.94 (m, 3H, CHOH), 4.30 (s, 6H, CH₂NH), 7.77 (s, 3H, NH). ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ: 17.00 (CH₃), 23.97 (CH₂), 31.14 (CH₂), 32.60 (CH₂), 40.52 (CH₂), 68.54 (CH), 70.02 (CH), 72.50 (CH), 133.24 (C), 146.68 (C), 178.94 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 4.04 min. Análisis elemental (%) teórico para C₃₆H₅₇N₃O₁₂: C, 59.73; H, 7.94; N, 5.81. Hallado: C, 59.99; H, 7.88; N, 5.51

1,3,5-Tris(*N*-trans-dibenciloxicafeoilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (15)



A una disolución de ácido dibenciloxicafeico (721 mg, 2 mmol) en DMF (20 mL) se le añade triamina **4**³ (100 mg, 0.4 mmol), HOBt (270 mg, 2 mmol), EDC (354 μL, 2 mmol) y trietilamina (256 μL, 2 mmol). La mezcla de reacción se hace reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y a continuación se elimina el disolvente a vacío. El residuo resultante se tritura con acetona y éter, obteniéndose 476 mg (93%) de **15** como un sólido amarillo; p.f. 208-210 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.11 (m, 9H, CH₃CH₂), 2.73 (m, 6H, CH₂CH₃), 4.43 (s, 6H, CH₂NH), 5.11 (s, 6H, CH₂Ar), 5.14 (s, 6H, CH₂Ar), 6.57 (d, *J* = 15.7 Hz, 3H, CH=CH), 7.05 (s, 3H, Ar), 7.21-7.43 (m, 45H, CH=CH, Ar), 7.94 (s, 3H, NH). Análisis elemental (%) teórico para C₈₄H₈₁N₃O₉: C, 79.03; H, 6.40; N, 3.29. Hallado: C, 78.91; H, 6.51; N, 3.53.

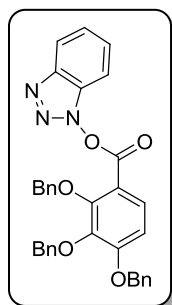
1,3,5-Tris(*N*-3,4-dihidroxifenilpropionilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (**16**)



El compuesto **15** (476 mg, 0.37 mmol) se desprotege siguiendo el método general B. El residuo final se trata con DCM y el sólido resultante se purifica por trituración con hexano, obteniéndose 143 mg (48%) de **16** como un sólido blanco; p.f. 180-182 °C. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para $C_{42}H_{25}N_3O_9^+$ ($M+H$)⁺ 742.3704; encontrada 742.3657. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD)

δ : 1.05 (m, 9H, CH₃CH₂), 2.41 (m, 6H, CH₂CH₂), 2.52 (m, 6H, CH₂CH₃), 2.76 (t, J = 7.2 Hz, 6H, CH₂CH₂), 4.31 (s, 6H, CH₂NH), 6.51 (m, 3H, Ar), 6.62 (m, 6H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ : 16.85 (CH₃), 24.13 (CH₂), 32.78 (CH₂), 39.36 (CH₂), 39.42 (CH₂), 116.76 (CH), 117.05 (CH), 121.06 (C), 133.02 (C), 134.02 (C), 145.03 (C), 145.66 (C), 146.60 (C), 175.49 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 5.64 min. Análisis elemental (%) teórico para C₄₂H₅₁N₃O₉: C, 68.56; H, 6.16; N, 5.71. Hallado: C, 68,39; H, 6.39; N, 5.61.

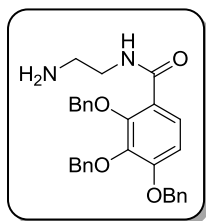
1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il-2,3,4-tris(benciloxi)benzoato (**18**)



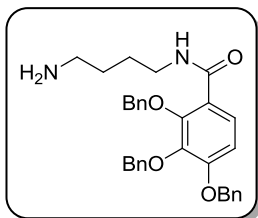
A una disolución de **17** (750 mg, 1.70 mmol) y PyBOP (1.15 g, 2.21 mmol) en DCM (8.5 mL) se le añade trietilamina (307 μ L, 2.21 mmol). La mezcla se deja reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, el crudo de reacción se concentra y purifica por trituración con metanol, obteniéndose 845 mg de **18** (89 %) como un sólido amorfo blanco.

MS (ES, positivo): m/z 558 ($M+1$)⁺, 580 ($M+Na$)⁺, ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)

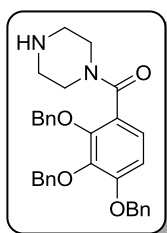
δ : 5.09 (s, 2H, CH₂Ar), 5.22 (s, 2H, CH₂Ar), 5.24 (s, 2H, CH₂Ar), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 1H, Ar), 7.27-7.51 (m, 18H, Ar), 7.97 (d, J = 9.0 Hz, 1H, Ar), 8.09 (dt, J = 8.2, 0.9 Hz, 1H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ : 71.1 (CH₂), 75.7 (CH₂), 76.6 (CH₂), 108.7 (CH), 109.1 (C), 112.5 (CH), 120.3 (CH), 124.7 (CH), 127.5 (CH), 128.3-129.0 (CH), 135.5 (C), 136.4 (C), 136.7 (C), 142.8 (C), 143.5 (C), 155.2 (C), 158.9 (C), 160.8 (C), 164.0 (C=O).

N-(2-aminoetil)-2,3,4-tris(benciloxi)benzamida (19)

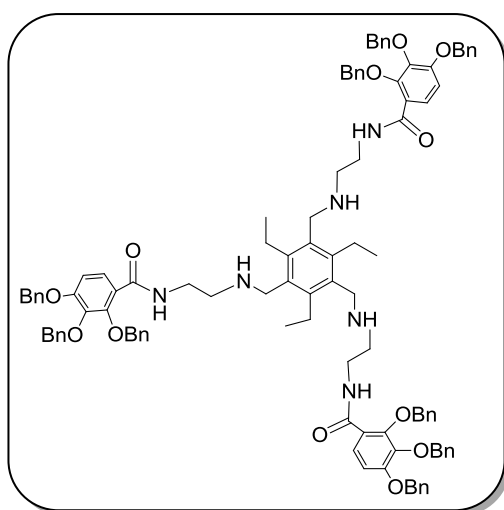
A una disolución del compuesto **18** (593 mg, 1.06 mmol) en DCM seco (20 mL) se le adiciona gota a gota una disolución de etilendiamina (433 μ L, 6.38 mmol) en DCM seco (5 mL). La mezcla se deja reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente y el disolvente se evapora a sequedad. El crudo de reacción se disuelve en DCM (25 mL) y se lava con disolución de NaCl (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a sequedad. El residuo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol \rightarrow DCM/metanol/amoniaco 10:1 \rightarrow 10:1:0.2) obteniendo 482 mg (94%) de **19** como un aceite amarillo. MS (ES, positivo): m/z 483 ($M+1$)⁺. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.85 (s_{ancho} , 2H, CH_2NH_2), 3.35 (m, 2H, CH_2NH), 5.06 (s, 2H, CH_2Ar), 5.15 (s, 2H, CH_2Ar), 5.16 (s, 2H, CH_2Ar), 6.87 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, Ar), 7.28-7.46 (m, 15H, Ar), 7.84 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, Ar), 8.22 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, NH). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 41.2 (CH_2), 42.2 (CH_2), 70.6 (CH_2), 75.4 (CH_2), 76.8 (CH_2), 108.8 (CH), 119.4 (C), 126.6 (CH), 127.3-126.6 (CH), 135.9 (C), 136.1 (C), 136.9 (C), 140.8 (C), 151.5 (C), 155.4 (C), 165.0 (C=O).

N-(4-aminobutil)-2,3,4-tris(benciloxi)benzamida (20)

El compuesto **18** (250 mg, 0.45 mmol) y 1,4-diaminobutano (270 μ L, 2.67 mmol) se hacen reaccionar según el método descrito para **19**. El residuo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol \rightarrow DCM/metanol/amoniaco 10:1 \rightarrow 10:1:0.2) para obtener 205 mg (89%) de **20** como un aceite incoloro. MS (ESI, positivo): m/z 512 ($M+1$)⁺. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.29 (m, 4H, CH_2CH_2), 1.92 (s_{ancho} , 2H, NH_2), 2.63 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2NH_2), 3.25 (m, 2H, CH_2NH), 5.07 (s, 2H, CH_2Ar), 5.14 (s, 2H, CH_2Ar), 5.16 (s, 2H, CH_2Ar), 6.88 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, Ar), 7.31-7.45 (m, 15H, Ar), 7.90-7.94 (m, 2H, Ar, NH). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ : 26.6 (CH_2), 30.4 (CH_2), 39.3 (CH_2), 41.5 (CH_2), 70.8 (CH_2), 75.7 (CH_2), 77.2 (CH_2), 109.1 (CH), 119.5 (C), 126.8 (CH), 127.5, 128.2 (CH), 128.4 (CH), 128.6-128.7 (CH), 136.2 (C), 136.4 (C), 137.1 (C), 141.0 (C), 151.7 (C), 155.6 (C), 164.8 (C=O).

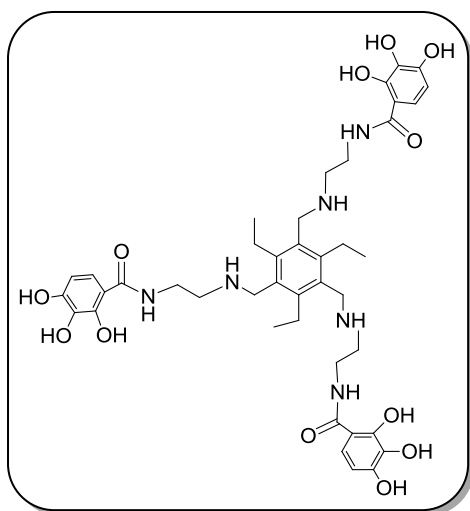
Piperazin-1-il-(2,3,4-tris(benciloxi)fenil)metanona (21)

El compuesto **18** (250 mg, 0.45 mmol) y piperazina (235 mg, 2.67 mmol) se hacen reaccionar siguiendo el método descrito para **19**. El residuo se purifica por CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol 20:1) para obtener 225 mg (99%) de **21** como un aceite amarillo. MS (ESI, positivo) m/z 509 (M+1)⁺; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 2.67 (m, 3H, CH₂CH₂), 2.86 (m, 1H, CH₂CH₂), 3.12 (m, 2H, CH₂CH₂), 3.72 (m, 2H, CH₂CH₂), 4.88 (d, J = 10.6 Hz, 1H, CH₂Ar), 5.04-5.20 (m, 5H, CH₂Ar), 6.81 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 6.97 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.24-7.48 (m, 15H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ : 42.6 (CH₂), 45.4 (CH₂), 45.9 (CH₂), 47.9 (CH₂), 71.0 (CH₂), 75.2 (CH₂), 76.3 (CH₂), 109.8 (CH), 122.7 (C), 124.3 (CH), 127.4 (CH), 128.0-128.8 (CH), 136.5 (C), 137.1 (C), 137.3 (C), 141.2 (C), 149.5 (C), 154.0 (C), 167.4 (C=O).

1,3,5-Tris(2,3,4-tribenciloxibenzamidoetilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (22)

A una disolución de **19** (231 mg, 0.47 mmol) y el tribromo **2**³ (50 mg, 0.11 mmol) en DCM (1 mL) se le añade trietilamina (65 μ L, 0.47 mmol). La mezcla se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y se evapora a sequedad. El crudo de reacción se disuelve en DCM (15 mL) y se lava con NaCl (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), filtra y evapora a sequedad. El residuo se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol/amoniaco 15:1:0.4) para obtener 106 mg (57%) de **22** como un aceite incoloro. MS (ESI, positivo): m/z 1647 (M+1)⁺; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.14 (t, J = 7.2 Hz, 9H, CH₃CH₂), 2.63-2.69 (m, 12H, CH₂CH₃, CH₂CH₂), 3.36 (q, J = 5.8 Hz, 6H, CH₂CH₂), 3.61 (s, 6H, CH₂NH), 5.04 (s, 6H, CH₂Ar), 5.09 (s, 6H, CH₂Ar), 5.14 (s, 6H, CH₂Ar), 6.86 (dd, J = 9.2, 0.5 Hz, 3H, Ar), 7.22-7.41 (m, 45H, Ar), 7.88 (dd, J = 8.9, 0.7 Hz, 3H, Ar), 8.01 (t, J = 5.2 Hz, 3H, NH). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : 17.0 (CH₃), 22.6 (CH₂), 39.5 (CH₂), 47.5 (CH₂), 49.4 (CH₂), 70.8 (CH₂), 75.6 (CH₂), 109.1 (CH), 119.9 (C), 126.7 (CH), 127.5 (CH), 128.1-128.8 (CH), 134.0 (C), 136.2 (C), 137.1 (C), 141.1 (C), 142.1 (C), 151.7 (C), 155.6 (C), 164.9 (C=O).

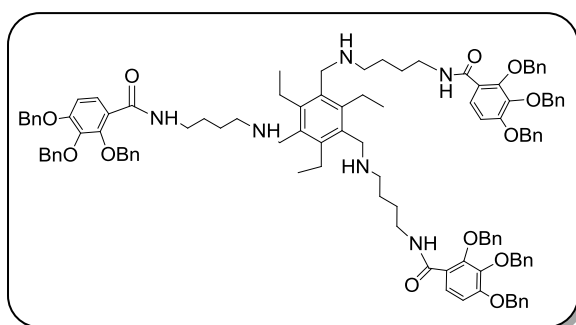
1,3,5-Tris(2,3,4-trihidroxibenzamidoetilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (**23**)



El compuesto **22** (119 mg, 0.23 mmol) se desprotege según el método general B obteniendo 45 mg (96%) de **23** como un sólido blanco; m.p. 164-166 °C. MS (ESI, positivo): m/z 835 ($M+1$)⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ : 1.19 (t, J = 7.3 Hz, 9H, CH₃CH₂), 2.91 (q, J = 7.3 Hz, 6H, CH₂CH₃), 3.50 (m, 6H, CH₂CH₂), 3.81 (m, 6H, CH₂CH₂), 4.22 (s, 6H, CH₂NH), 6.39 (d, J = 8.8 Hz, 3H, Ar), 7.22 (d, J = 8.8 Hz, 3H, Ar). ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD) δ : 16.6

(CH₃), 25.7 (CH₂), 37.5 (CH₂), 43.3 (CH₂), 50.2 (CH₂), 108.2 (C), 108.4 (CH), 120.0 (CH), 128.9 (C), 134.1 (C), 149.4 (C), 151.4 (C), 150.7 (C), 173.2 (C=O). Análisis elemental (%) teórico para C₄₂H₅₄N₆O₁₂: C, 60.42; H, 6.52; N, 10.07. Hallado C, 60.21; H, 6.75; N, 9.94.

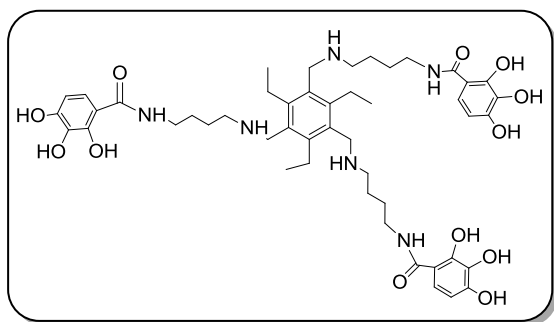
1,3,5-Tris(2,3,4-tribenciloxibenzamidobutilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (**24**)



El compuesto **20** (133 mg, 0.26 mmol), tribromo **2**³ (29 mg, 0.07 mmol) y trietilamina (36 μ L, 0.47 mmol) se hacen reaccionar siguiendo el procedimiento descrito para **22**. El residuo se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón

(DCM/metanol 10:1) para obtener 51 mg (46%) de **24** como un aceite amarillo. MS (ESI, positivo): m/z 866 ($1/2M+1$)⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.15 (t, J = 6.2 Hz, 9H, CH₃CH₂), 1.37 (m, 6H, CH₂CH₂), 1.64 (m, 6H, CH₂CH₂), 2.88 (m, CH₂CH₃, CH₂NH), 3.20 (m, 6H, CH₂NH), 3.93 (s_{ancho}, 6H, CH₂NH), 5.05 (s, 6H, CH₂Ar), 5.12 (s, 6H, CH₂Ar), 5.14 (s, 6H, CH₂Ar), 6.86 (d, J = 7.8 Hz, 3H, Ar), 7.26-7.42 (m, 45H, Ar), 7.86 (d, J = 7.8 Hz, 3H, Ar), 7.94 (m, 3H, NH). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : 17.1 (CH₃), 24.2 (CH₂), 25.0 (CH₂), 27.2 (CH₂), 39.1 (CH₂), 46.63 (CH₂), 49.5 (CH₂), 71.09 (CH₂), 75.91 (CH₂), 77.59 (CH₂), 109.1 (CH), 119.7 (CH), 127.8 (CH), 128.4 (CH), 128.6 (CH), 128.8 (CH), 128.9 (CH), 129.0 (CH), 129.1 (CH), 136.4 (C), 137.3 (C), 141.3 (C), 152.0 (C), 156.0 (C), 165.3 (C=O).

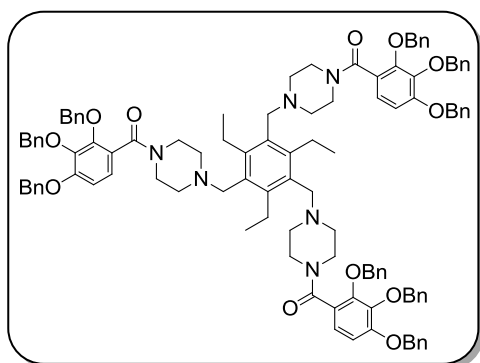
1,3,5-Tris(2,3,4-trihidroxibenzamidobutilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (25)



El compuesto **24** (50 mg, 0.023 mmol) se desprotege siguiendo el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (agua/acetonitrilo 100:0→70:30) para obtener 7 mg (27%) de **25** como un sólido

amorfo blanco. MS (ESI, positivo): m/z 920 ($M+1$)⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ : 1.18 (t, J = 7.5 Hz, 9H, CH₃CH₂), 1.72 (m, 6H, CH₂CH₂), 1.85 (m, 6H, CH₂CH₂), 2.87 (q, J = 7.3 Hz, 6H, CH₂CH₃), 3.32 (m, 6H, CH₂NH), 3.40 (m, 6H, CH₂NH), 3.81 (m, 6H, CH₂NH), 4.32 (s, 6H, CH₂NH), 6.35 (d, J = 8.8 Hz, 3H, Ar), 7.09 (d, J = 8.8 Hz, 3H, Ar). ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD) δ : 16.3 (CH₃), 24.1 (CH₂), 25.3 (CH₂), 27.7 (CH₂), 38.9 (CH₂), 45.9 (CH₂), 108.0 (C), 108.6 (CH), 119.1 (CH), 128.8 (C), 134.0 (C), 149.3 (C), 150.9 (C), 151.4 (C), 172.2 (C=O). Análisis elemental (%) teórico para C₄₈H₆₆N₆O₁₂: C, 66.73; H, 7.24; N, 9.14. Hallado C, 66.97; H, 7.16; N, 9.08.

1,3,5-Tris[[4-(2,3,4-tribenciloxifenilcarbonil)-piperazin-1-il]metil]-2,4,6-trietilbenceno (26)



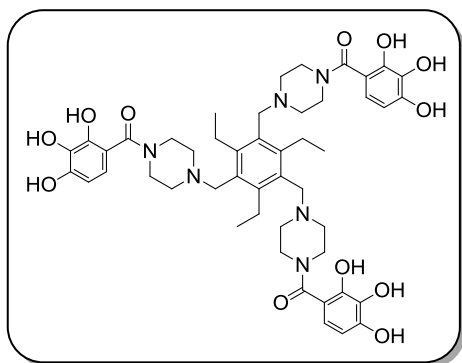
El compuesto **21** (198 mg, 0.39 mmol), tribromo derivado **2³** (43 mg, 0.10 mmol) y trietilamina (54 μ L, 0.39 mmol) se hacen reaccionar siguiendo el procedimiento descrito para **22**. El residuo se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol 30:1) para obtener 127 mg (75%) de **26** como un aceite amarillo. MS (ESI, positivo): m/z

1725 ($M + 1$)⁺, 863 ($1/2M + 1$)⁺; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂O) δ : 1.09 (t, J = 6.9 Hz, 9H, CH₃CH₂), 2.27 (m, 6H, CH₂CH₃), 2.33 (m, 3H, CH₂CH₂), 2.46 (m, 3H, CH₂CH₂), 2.90 (m, 6H, CH₂CH₂), 3.01 (m, 6H, CH₂CH₂), 3.47 (m, 9H, CH₂CH₂, CH₂NH), 3.70 (m, 3H, CH₂CH₂), 4.90 (m, 3H, CH₂Ar), 5.08-5.19 (m 15H, CH₂Ar), 6.88-6.93 (m, 6H, Ar), 7.20-7.24 (m, 9H, H-Ar), 7.35-7.41 (m, 30H, Ar), 7.53-7.55 (m, 6H, Ar). ¹³C-RMN (100 MHz, (CD₃)₂O) δ : 17.0 (CH₃), 22.3

(CH₂), 42.4 (CH₂), 47.8 (CH₂), 52.9 (CH₂), 53.2 (CH₂), 55.7 (CH₂), 71.5 (CH₂), 75.5 (CH₂), 76.5 (CH₂), 110.5 (CH), 123.2 (C), 125.9 (CH), 128.6-129.6 (CH), 131.9 (C), 138.0 (C), 138.4 (C), 138.6 (C), 141.9 (C), 145.4 (C), 150.3 (C), 154.6 (C), 167.2 (C=O).

1,3,5-Tris[[4-(2,3,4-trihidroxifenilcarbonil)-piperazin-1-il]metil]-2,4,6-trietilbenceno

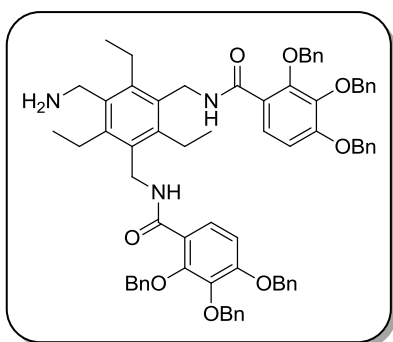
(27)



El compuesto **26** (122 mg, 0.07 mmol) se desprotege siguiendo el método general B. El residuo final se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (agua/acetonitrilo 100:0→80:20) para obtener 32 mg (50%) de **27** como un sólido blanco; p.f. >350 °C. MS (ESI, positivo): m/z 914

(M+1)⁺. ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂O) δ: 1.10 (t, J = 7.2 Hz, 9H, CH₃CH₂), 3.17 (m, 6H, CH₂CH₃), 3.45 (s_{ancho}, 12H, CH₂CH₂), 3.88 (s_{ancho}, 12H, CH₂CH₂), 4.57 (s, 6H, CH₂NH), 6.41 (d, J = 8.5 Hz, 3H, Ar), 6.70 (d, J = 8.5 Hz, 3H, Ar). ¹³C-RMN (100 MHz, (CD₃)₂O) δ: 16.5 (CH₃), 29.0 (CH₂), 50.5 (CH₂), 52.6 (CH₂), 54.8 (CH₂), 107.5 (CH), 113.1 (C), 119.3 (CH), 129.2 (C), 133.4 (C), 145.9 (C), 148.3 (C), 169.3 (C=O). Análisis elemental (%) teórico para C₄₈H₆₀N₆O₁₂: C, 63.14; H, 6.62; N, 9.20. Hallado C, 63.37; H, 6.60; N, 9.48.

1-Aminometil-3,5-bis(2,3,4-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (28)

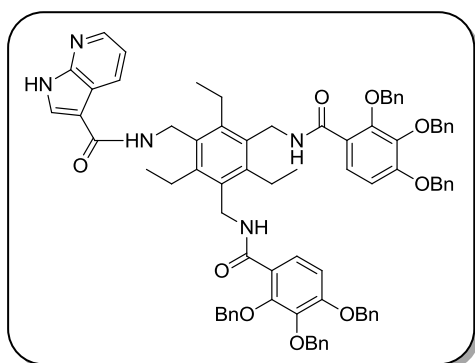


A una disolución del ácido 2,3,4-tribenziloxibenzoico⁷ (222 mg, 0.50 mmol) y PyBOP (263 mg, 0.50 mmol) en DCM (3 mL) se le añade trietilamina (70 µL, 0.50 mmol). La mezcla se deja reaccionar durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente se añade gota a gota una suspensión de la triamina **4**³ (63 mg, 0.25

mmol) en DCM (1 mL). La mezcla se deja reaccionar durante dos horas a temperatura ambiente y el disolvente se evapora a sequedad. El crudo de reacción se disuelve en DCM y lava con una disolución de NaCl (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca (MgSO₄), filtra y evapora. El residuo se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol, 20:1) para obtener 114 mg (41%) de **28** como un sólido amorfo amarillo pálido. MS (ES, positivo) m/z:

1094 (M+1)⁺. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.96-1.28 (m, 9H, CH₃CH₂), 2.44 (m, 2H, CH₃CH₂), 2.66 (m, 4H, CH₃CH₂), 3.93 (m, 2H, CH₂NH₂), 4.52-4.60 (m, 4H, CH₂NH), 4.83-4.94 (m, 8H, CH₂Ar), 5.14 (m, 4H, CH₂Ar), 6.78-7.40 (m, 32, Ar), 7.85 (m, 2H, NH), 7.94 (m, 2H, Ar).

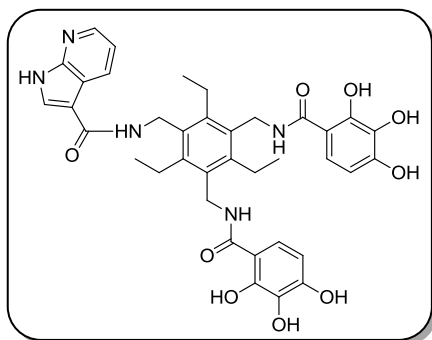
1-(1*H*-Pirrol[2,3-*b*]piridinil-3-carbonilaminometil)-3,5-bis(2,3,4-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (29)



A una disolución que contiene el compuesto **28** (114 mg, 0.10 mmol), ácido 7-azaindol-3-carboxílico (34 mg, 0.21 mmol) y PyBOP (108, 0.21 mmol) en DCM (1 mL) se le añade trietilamina (29 µL, 0.21 mmol). La mezcla se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y el disolvente se evapora a sequedad. El residuo se purifica mediante

CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol 20:1) para obtener 101 mg (78%) de **29** como un aceite incoloro. MS (ESI, positivo) *m/z*: 1239 (M+1)⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H, CH₃CH₂), 2.49 (m, 2H, CH₃CH₂), 2.74 (m, 4H, CH₃CH₂), 4.61-4.67 (m, 6H, CH₂NH), 4.87 (m, 8H, CH₂Ar), 5.15 (m, 4H, CH₂Ar), 6.71 (s, 1H, Ar), 6.81-7.43 (m, 34H, Ar), 7.94-7.98 (m, 4H, NH, Ar), 8.25 (dd, *J* = 5.6, 1.2 Hz, 1H, Ar), 8.96 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H, Ar). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 16.5 (CH₃), 23.0 (CH₂), 37.9 (CH₂), 38.1 (CH₂), 70.9 (CH₂), 75.6 (CH₂), 109.4 (CH), 111.7 (C), 116.9 (C), 119.2 (C), 124.8 (CH), 126.9 (CH), 127.6-128.6 (CH), 131.5 (CH), 132.9 (C), 136.1 (C), 136.7 (C), 138.8 (CH), 139.8 (CH), 141.0 (C), 144.1 (C), 144.7 (C), 151.5 (C), 155.9 (C), 162.0 (C=O), 164.5 (C=O).

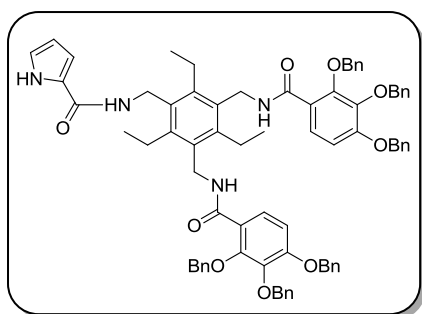
1-(1*H*-Pirrol[2,3-*b*]piridinil-3-carbonilaminometil)-3,5-bis(2,3,4-trihidroxi-benzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (30)



El compuesto **29** (92 mg, 0.07 mmol) se desprotege siguiendo el método general B. El residuo final se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (agua/acetonitrilo, 80:20→60:40) para obtener 11 mg (21%) de **30** como un sólido amorfo blanco. MS (ESI, positivo) m/z : 698 ($M+1$)⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ :

1.22-1.29 (m, 9H, CH₃CH₂), 2.94 (m, 6H, CH₃CH₂), 4.70 (m, 6H, CH₂NH), 6.34 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar), 7.20 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar), 7.31 (dd, J = 7.5, 5.1 Hz, 1H, Ar), 8.08 (s, 3H, NH), 8.30 (d, J = 4.4 Hz, 1H, Ar), 8.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar). ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD) δ : 16.7 (CH₃), 24.1 (CH₂), 39.1 (CH₂), 108.0 (C), 109.5 (CH), 110.8 (C), 118.3 (C), 120.2 (CH), 120.9 (CH), 129.7 (CH), 131.9 (CH), 133.1 (C), 133.3 (CH), 133.9 (C), 144.1 (C), 145.7 (C), 145.9 (C), 150.6 (C), 150.8 (C), 167.0 (C=O), 170.7 (C=O). Análisis elemental (%) teórico para C₃₇H₃₉N₅O₉: C, 63.69; H, 5.63; N, 10.04. Hallado C, 63.54; H, 5.60; N, 10.18.

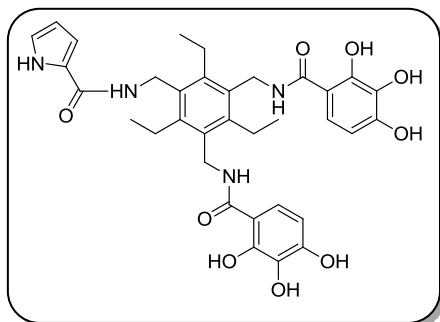
1-(2-Carbonilaminometil-1*H*-pirrol)-3,5-bis(2,3,4-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (31)



Una mezcla de **28** (114 mg, 0.10 mmol), ácido pirrol 2-carboxílico (23 mg, 0.21 mmol), PyBOP (108, 0.21 mmol) y trietilamina (29 μ L, 0.21 mmol) en DCM (1 mL) se hacen reaccionar según el método general A. El residuo se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol 30:1) para obtener 110 mg (89%) de **31**

como un aceite amarillo. MS (ESI, positivo) m/z : 1189 ($M+1$)⁺. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.08 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.19 (t, J = 7.3 Hz, 6H, CH₃CH₂), 2.52 (q, J = 6.6 Hz, 2H, CH₃CH₂), 2.67 (m, J = 6.8 Hz, 4H, CH₃CH₂), 4.54 (m, 2H, CH₂NH), 4.65 (m, 4H, CH₂NH), 4.89 (s, 8H, CH₂Ar), 5.15 (s, 4H, CH₂Ar), 5.32 (m, 1H, Ar), 5.67 (m, 1H, Ar), 6.01 (m, 1H, Ar), 6.83-6.85 (m, 4H, Ar), 6.90 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar), 7.03-7.44 (m, 26H, Ar), 7.91-7.94 (m, 2H, NH), 7.96 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar), 9.33 (s_{ancho}, 1H, NH).

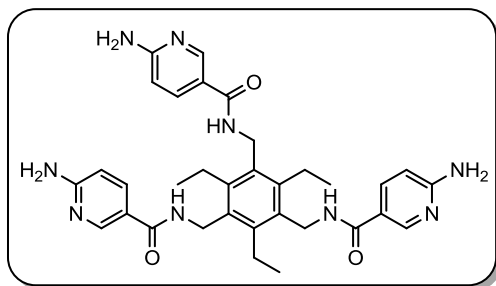
1-(2-Carbonilaminometil-1H-pirrol)-3,5-bis(2,3,4-trihidroxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (32)



El compuesto **31** (98 mg g, 0.08 mmol) se desprotege según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (agua/acetonitrilo 80:20→60:40) para obtener 25 mg (47%) de **32** como un sólido amorfo blanco. MS (ESI, positivo) m/z : 1089 ($M+1$).⁺; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)

δ : 1.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 9H, CH₃CH₂), 2.89 (q, $J = 6.8$ Hz, 6H, CH₃CH₂), 4.63 (s, 2H, CH₂NH), 4.67 (s, 4H, CH₂NH), 6.12 (m, 1H, Ar), 6.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar), 6.78 (m, 1H, Ar), 6.89 (m, 1H, Ar), 7.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar), 10.91 (s_{ancho}, 1H, NH). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) δ : 16.7 (CH₃), 23.4 (CH₂), 37.9 (CH₂), 38.12 (CH₂), 107.11 (C), 107.8 (CH), 109.2 (CH), 111.5 (CH), 118.9 (CH), 121.5 (CH), 126.2 (C), 132.0 (C), 132.6 (C), 132.9 (C), 144.6 (C), 149.7 (C), 150.6 (C), 161.0 (C=O), 169.8 (C=O). Análisis elemental (%) teórico para C₃₄H₃₈N₄O₉: C, 63.15; H, 5.92; N, 8.66. Hallado C, 62.97; H, 6.09; N, 8.73.

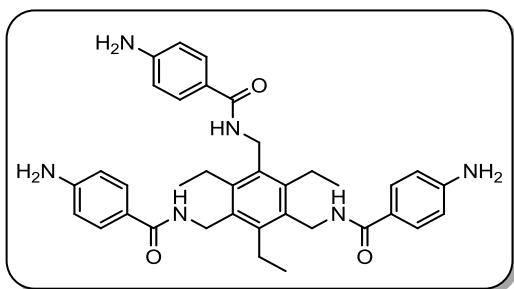
1,3,5-Tris(6-aminopiridinil-3-carbonilaminometil)-2,4,6-trietilbenceno (33)



Una mezcla de ácido 6-aminonicotínico comercial (111 mg, 0.8 mmol), PyBOP (424 mg, 0.8 mmol), triamina **4**³ (50 mg, 0.2 mmol) y trietilamina (102 μ L, 0.8 mmol) en DMF (20 mL) se hacen reaccionar según el método general A.

El residuo se purifica por trituración con metanol/éter para obtener 99.94 mg (82%) de **33** como un sólido blanco; p.f. 267-269 °C. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para C₃₃H₃₉N₉O₃ 609.3176; encontrada 609.3176. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.09 (m, 9H, CH₃CH₂), 2.81 (m, 6H, CH₂CH₃), 4.50 (s, 6H, CH₂NH), 6.41 (m, 3H, Ar), 7.84 (m, 3H, Ar), 8.07 (s_{ancho}, 6H, NH₂Ar), 8.40 (s, 3H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 15.90 (CH₃), 22.36 (CH₂), 38.35 (CH₂), 106.21 (CH), 117.52 (C), 131.81 (C), 136.01 (C), 143.22 (CH), 148.32 (CH), 161.00 (C), 164.71 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 4.39 min.

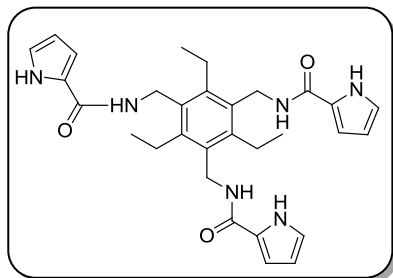
1,3,5-Tris(4-aminobenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (**34**)



Una mezcla de ácido 4-aminobenzoico comercial (110 mg, 0.8 mmol), PyBOP (424 mg, 0.8 mmol), triamina **4**³ (50 mg, 0.2 mmol) y trietilamina (102 μ L, 0.8 mmol) en DMF (20 mL) se hacen reaccionar según el método general

A. El residuo se purifica por trituración con metanol/éter para obtener 25 mg (21%) de **34** como un sólido blanco; p.f. >350 °C. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para $C_{36}H_{42}N_6O_3$ 606.3318; encontrada 606.333. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.10 (t, J = 7.4 Hz, 9H, CH_3CH_2), 2.77 (m, 6H, CH_2CH_3), 4.49 (s, 6H, CH_2NH), 5.23 (s_{ancho} , 6H, NH_2), 6.48 (d, J = 8.7 Hz, 6H, Ar), 7.38 (s_{ancho} , 3H, NH), 7.53 (d, J = 8.7 Hz, 6H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 16.91 (CH_3), 23.34 (CH_2), 38.45 (CH_2), 113.18 (CH), 121.80 (CH), 129.49 (C), 132.75 (C), 144.11 (C), 151.99 (C), 166.97 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A de 10 min]: 5.51 min.

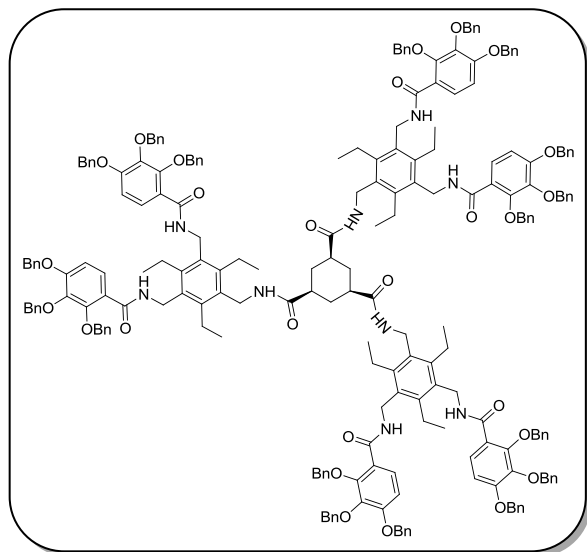
1,3,5-Tris(2-etilcarbamoil-1H-pirrol)-2,4,6-trietilbenceno (**35**)



En la literatura¹⁶ se emplea un método sintético distinto para la obtención de este compuesto y el espectro de ¹H-RMN se registra en DMSO- d_6 . Un nuevo procedimiento sintético y los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN en metanol- d_4 se indican a continuación. Una mezcla

de ácido 2-pirrolcarboxílico (89 mg, 0.80 mmol), triamina **4**³ (50 mg, 0.20 mmol), PyBOP (417 mg, 0.80 mmol) y trietilamina (111 μ L, 0.80 mmol) en DCM (2 mL) se hacen reaccionar según el método general A. El residuo se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (acetato de etilo) para obtener 57 mg (54%) de **35** como un sólido blanco; p.f.: > 250 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 1.19 (t, J = 7.4 Hz, 9H, CH_3CH_2), 2.90 (q, J = 7.4 Hz, 6H, CH_2CH_3), 4.63 (s, 6H, CH_2NH), 6.13 (dd, J = 3.7, 2.6 Hz, 3H, Ar), 6.76 (dd, J = 3.7, 1.4 Hz, 3H, Ar), 6.90 (dd, J = 2.5, 1.4 Hz, 3H, Ar). ¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD) δ : 16.7 (CH_3), 24.1 (CH_2), 38.9 (CH_2), 110.2 (CH), 112.3 (CH), 123.0 (CH), 126.6 (C), 133.1 (C), 145.7 (C), 163.5 (C=O).

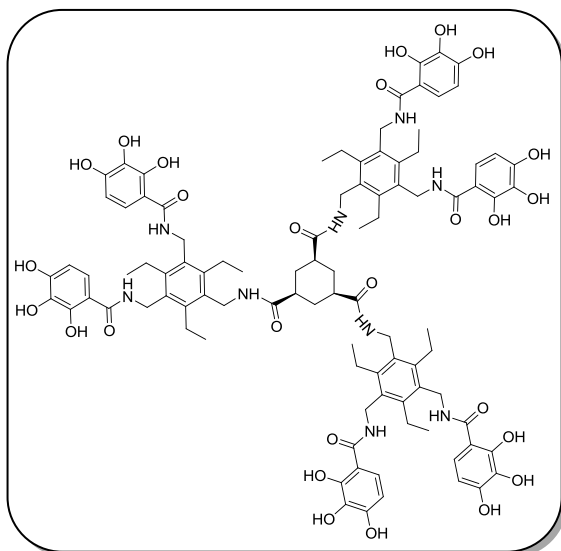
***Cis-N¹,N³,N⁵*-Tris[3,5-bis(2,3,4-tribenciloxybenzamidotetil)-1-metil-2,4,6-trietilfenil]-1,3,5-ciclohexantricarboxamida (**37**)**



Una mezcla de **28** (137 mg, 0.15 mmol), ácido *cis*-1,3,5-ciclohexantricarboxílico (10 mg, 0.05 mmol), PyBOP (78 mg, 0.15 mmol) y trietilamina (33 μ L, 0.24 mmol) en DCM (5 mL) hacen reaccionar según el método general A para dar un residuo que se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol 20:1) para

obtener 69 mg (92%) de **37** como un aceite incoloro. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.08 (m, 27H, CH_3CH_2), 1.34 (m, 3H, CH_2CH), 1.72 (m, 3H, CH_2CH), 2.49-2.58 (m, 18H, CH_3CH_2), 3.15 (m, 3H, CHCH_2), 4.30 (s_{ancho} , 6H, CH_2NH), 4.62 (s_{ancho} , 12H, CH_2NH), 4.89, 4.92 (s, 24H, CH_2Ar), 5.15 (s, 12H, CH_2Ar), 6.81-7.52 (m, 96H, Ar), 7.89 (m, 6H, NH), 7.97 (d, 6H, Ar). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 16.3 (CH_3), 16.4 (CH_3), 22.9 (CH_2), 37.8 (CH_2), 38.3 (CH_2), 43.5 (CH_2), 69.7 (CH), 70.8 (CH_2), 75.5 (CH_2), 76.4 (CH_2), 109.3 (CH), 119.4 (C), 126.8 (CH), 127.5 (CH), 128.0-128.5 (CH), 131.3 (C), 132.6 (C), 135.9 (C), 136.0 (C), 136.8 (C), 141.0 (C), 143.8 (C), 144.3 (C), 151.4 (C), 155.8 (C), 164.4 (C=O), 173.0 (C=O).

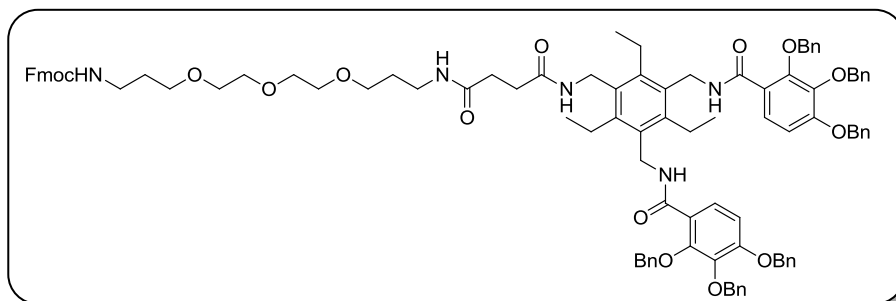
Cis-N¹,N³,N⁵-Tris[3,5-bis(2,3,4-trihidroxibenzamidometil)-1-metil-2,4,6-trietilfenil]-1,3,5-ciclohexantricarboxamida (38)



El compuesto **37** (147 mg g, 0.042 mmol) se desprotege siguiendo el método general B. El residuo se purifica mediante precipitación en una mezcla DCM/metanol para obtener 43.4 mg (57 %) de **38** como un sólido amorfo marrón. Dicho sólido presenta una pureza del 90 % por HPLC. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para C₉₆H₁₁₁N₉O₂₇ 1821.7589; encontrada 1821.7681. ¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) δ:

1.14 (t, 18H, *J* = 7.5 Hz, CH₃CH₂), 1.19 (t, 9H, *J* = 7.5 Hz, CH₃CH₂), 1.59-1.73 (m, 3H, CH₂CH), 1.76-1.85 (m, 3H, CH₂CH), 2.21-2.30 (m, 3H, CHCH₂), 2.76 (q, 12H, *J* = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 2.88 (q, 6H, *J* = 7.5 Hz, CH₂CH₃), 4.40 (s, 6H, CH₂NH), 4.64 (s, 12H, CH₂NH), 6.34 (d, 6H, *J* = 9.8 Hz, Ar), 7.19 (d, 6H, *J* = 9.8 Hz, Ar). ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD) δ: 15.44 (CH₃), 15.53 (CH₃), 22.67 (CH₂), 22.89 (CH₂), 31.42 (CH₂), 37.87 (CH₂), 43.36 (CH), 107.95 (CH), 109.52 (C), 120.22 (CH), 133.08 (C), 133.94 (C), 145.63 (C), 150.63 (C), 150.78 (C), 170.73 (C=O), 177.04 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A de 10 min]: 7.29 min.

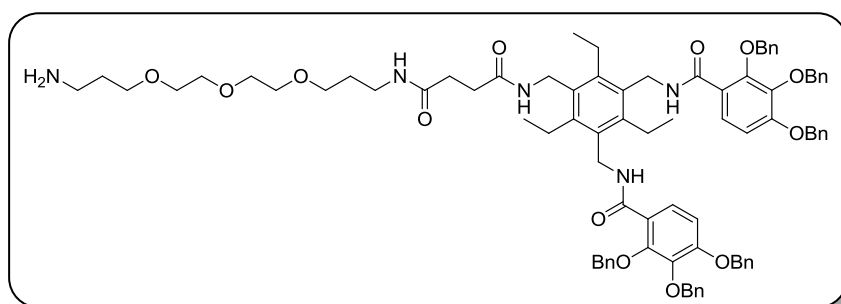
1-N-[Fmoc-18-amino-4-oxo-9,12,15-trioxa-5-aminooctadecanoil]aminometil-3,5-bis(2,3,4-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (40).



A una disolución que contiene el compuesto **28** (233 mg, 0.21 mmol) y PyBOP (222 mg, 0.43 mmol) en DCM (2 mL) se le añade ácido Fmoc-18-amino-4-oxo-9,12,15-trioxa-5-aminooctadecanoico **39**^{18b} (232 mg, 0.43 mmol) y trietilamina (60 µL, 0.43 mmol) a temperatura

ambiente. La mezcla se deja reaccionar durante una hora a temperatura ambiente y el disolvente se evapora a sequedad. Seguidamente el crudo de reacción se disuelve en DCM (50 mL) y se lava con NaCl (2 x 20 mL). La fase orgánica se seca (MgSO_4), filtra y evapora a sequedad. El residuo se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol, 20:1) para obtener 326 mg (95%) de **40** como un sólido amorfo amarillo pálido. MS (ESI, positivo) m/z : 1620 ($\text{M}+1$)⁺; ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.05 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_3CH_2), 1.67-1.78 (m, 4H, CH_2CH_2), 2.23 (m, 2H, CH_2CH_2), 2.38-2.50 (m, 4H, CH_3CH_2 , CH_2CH_2), 2.66 (m, 4H, CH_3CH_2), 3.35 (m, 4H, CH_2CH_2), 3.48-3.63 (m, 12H, CH_2CH_2), 4.21 (m, 2H, CH_2NH), 4.32-4.41 (m, 3H, CH_2CH , CHCH_2), 4.60 (m, 4H, CH_2NH), 4.88 (s, 4H, CH_2Ar), 4.91 (s, 4H, CH_2Ar), 5.14 (s, 4H, CH_2Ar), 6.89 (m, 6H, Ar), 7.05 (m, 4H, Ar), 7.14-7.41 (m, 34H, Ar), 7.59 (m, 2H, Ar), 7.75 (m, 2H, Ar), 7.89 (m, 2H, NH), 7.96 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H-Ar). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 16.6 (CH_3), 23.1 (CH_2), 24.6 (CH_2), 26.5 (CH_2), 26.6 (CH_2), 29.0 (CH_2), 29.6 (CH_2), 31.5 (CH_2), 38.1 (CH_2), 46.7 (CH_2), 46.8 (CH_2), 47.5 (CH_2), 66.6 (CH_2), 70.34 (CH_2), 70.7 (CH_2), 71.0 (CH_2), 75.8 (CH_2), 76.1 (CH_2), 109.5 (CH), 120.2 (CH), 125.3 (CH), 127.1 (CH), 127.2 (CH), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 128.5 (CH), 128.8 (C), 136.1 (C), 144.2 (C), 151.7 (C), 156.1 (C=O), 164.7 (C=O), 190.7 (C=O).

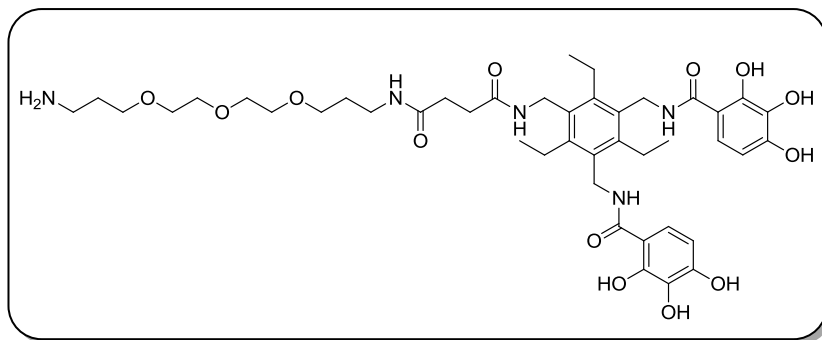
1-*N*[18-amino-4-oxo-9,12,15-trioxa-5-aminooctadecanoil]aminometil-3,5-bis(2,3,4-tribenciloxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (41)



Una disolución del compuesto **40** (325 mg, 0.20 mmol) en DCM (2 mL) se trata con piperidina (500 μL). La mezcla se deja reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente y el crudo de reacción se evapora a sequedad. El residuo se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón (DCM/metanol, 10:1) para obtener 217 mg (77%) de **41** como un sólido amorfo amarillo pálido. MS (ESI, positivo) m/z : 1397 ($\text{M}+1$)⁺; ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.92-1.03 (m, 9H, CH_3CH_2), 1.57 (m, 2H, CH_2CH_2), 1.77 (m, 2H, CH_2CH_2), 2.25 (m, 4H, CH_2CH_2),

2.50-2.59 (m, 2H, CH_2NH_2), 2.81 (m, 2H, CH_3CH_2), 3.03 (m, 4H, CH_3CH_2), 3.37-3.52 (m, 14H, CH_2CH_2), 4.21 (m, 2H, CH_2NH), 4.45 (m, 4H, CH_2NH), 4.89 (s, 4H, CH_2Ar), 4.91 (s, 4H, CH_2Ar), 5.19 (s, 4H, CH_2Ar), 7.03-7.57 (m, 34H, Ar), 7.89 (m, 4H, NH).

1-*N*-[18-amino-4-oxo-9,12,15-trioxa-5-aminooctadecanoil]aminometil-3,5-bis(2,3,4-trihidroxibenzamidometil)-2,4,6-trietilbenceno (42)



El compuesto **41** (129 mg g, 0.09 mmol) se desprotege siguiendo el método general B, obteniéndose 70 mg (89%) de **42** como un sólido amarillo pálido que se emplea directamente para los ensayos biológicos. MS (ESI, positivo) m/z 856 ($\text{M}+1$)⁺. ^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.18-1.23 (m, 9H, CH_3CH_2), 1.71 (m, 2H, CH_2CH_2), 1.91 (m, 2H, CH_2CH_2), 2.47 (s, 4H, CH_2CH_2), 2.81 (q, $J = 7.6$ Hz, 4H, CH_2CH_3), 2.90 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 3.08 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2CH_2), 3.20 (m, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2CH_2), 3.46 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2CH_2), 3.55 (m, 2H, CH_2CH_2), 3.60-3.65 (m, 8H, CH_2CH_2), 4.45 (m, 2H, CH_2NH), 4.66 (s, 4H, CH_2NH), 6.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar), 7.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, Ar). ^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) δ : 16.6 (CH_3), 16.7 (CH_3), 23.9 (CH_2), 24.1 (CH_2), 28.0 (CH_2), 30.4 (CH_2), 32.0 (CH_2), 32.2 (CH_2), 37.8 (CH_2), 38.9 (CH_2), 39.0 (CH_2), 40.2 (CH_2), 69.7 (CH_2), 70.4 (CH_2), 71.0 (CH_2), 71.3 (CH_2), 108.0 (C), 109.5 (CH), 120.2 (CH), 133.0 (C), 133.9 (C), 145.6 (C), 145.7 (C), 150.6 (C), 150.8 (C), 170.7 (C=O), 174.2 (C=O), 174.6 (C=O).

BIBLIOGRAFÍA

1. a) Balzarini, J.; Carrero, P.; Casanova, E.; Pérez-Pérez, M. J. and San-Félix, A. Gp120-binding benzene compounds and saccharide compounds. WO2011085454 (A1). **2011**;
b) Polifenoles como miméticos de lectinas: Una nueva aproximación en la terapia del SIDA. Tesis doctoral, Paula Carrero Berzal **2010**; c) Carrero, P.; Ardá, A.; Álvarez, M.; Doyagüez, E. G.; Rivero-Buceta, E.; Quesada, E.; Prieto, A; Solís, D.; Camarasa, M. J.; Pérez-Pérez, M. J.; Jiménez-Barbero, J. and San- Félix, A. Differential Recognition of Mannose-Based Polysaccharides by Tripodal Receptors Based on a Triethylbenzene Scaffold Substituted with Trihydroxybenzoyl Moieties. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 65-76.
2. Anslyn, E. and Hennrich, G. 1,3,5-2,4,6-Functionalized, Facially Segregated Benzenes Exploitation of Sterically Predisposed Systems in Supramolecular Chemistry. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8 (10), 2219-2224.
3. a) Walsdorff, C.; Saak, W. and Pohl, S. Synthesis of 1,3,5-tris(bromomethyl)-2,4,6-triethylbenzene – a versatile precursor to predisposed ligands *J. Chem.Res (M)* **1996**, 1601-1609; b) Metzger, A.; Lynch, V. and Anslyn, E. Ein synthetischer Citrat-selektiver Rezeptor. *Angew. Chem.* **1997**, 109, 911-914; c) Metzger, A.; Lynch, V. and Anslyn, E. A Synthetic Receptor Selective for Citrate *Angew. Chem Ed. Engl.* **1997**, 36, 862-864; d) Wallace, K. J.; Robert, J.; Anslyn, E.; Morey, J.; Kilway, K. V. and Siegel, J. Preparation of 1,3,5-Tris(aminomethyl)-2,4,6-triethylbenzene from Two Versatile 1,3,5-Tri(halosubstituted) 2,4,6-Triethylbenzene Derivatives. *Synthesis* **2005**, 12, 2080-2083.
4. McKittrick, B. A.; Scannell, R. T.; Stevenson, R. Natural Benzofurans: Synthesis of the Arylbenzofuran Constituents of *Sophora tomentosa*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1982**, 3017-3020.
5. (a) Stack, T., Hou, Z. and Raymond, K.N. Rational reduction of the conformational space of a siderophore analog through nonbonded interactions: the role of entropy in enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (14), 6466-6467; b) Hou, Z., Stack, T.D.P., Sunderland, C.J. and Raymond, K.N. Enhanced iron(III) chelation through ligand predisposition: syntheses, structures and stability of tris-catecholate enterobactin analogs. *Inorg. Chim. Acta* **1997**, 263, 341-355.

6. Belin, F., Barthélémy, P., Ruiz, K., Lacombe, J.M. and Pucci, B. Synthetic Gallic Acid Derivatives as Models for a Comprehensive Study of Antioxidant Activity. *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86 (2), 247-265.
7. N. Takashi, K. Kumiko, A. Akiko, M. Kenji, T. Koichiro, JP8143525 (A), **1996**.
8. Sundholm, E. G. Synthesis of 2,2',4,4',6,6'-Pentahydroxy-6-methyl benzophenone. *Acta Chemica Scandinavica, Series B* **1974**, 28, 1102–1103.
9. a) Benavente-García, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Ortuño, A. and del Río, J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, **2000**, 68, 457-462; b) Gordon, M.H.; Paiva-Martins, F. and Almeida, M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food, Chem.* **2001**, 49, 2480-2485; c) Chimi, H.; Cilalrd, J. and Rahmani, M. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1991**, 68, 307-312; d) Saija, A.; Trambetta, D.; Tomaino, A.; Lo Cascio, R.; Princi, P.; Uccella, N.; Bonina, F. and Castelli, F. 'In vitro' evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *International J. Pharmaceutics* **1998**, 166 (2), 1233-133; e) Fernández-Bolaños, J.G.; López, O.; López-García, M. A. and Marset, A. Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives. www.intechopen.com.
10. Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Rodriguez, G.; Trujillo, M.; Fernández-Bolaños, J. and Espartero, J. L. Synthesis of Hydroxytyrosyl Alkyl Ethers from Olive Oil Waste Waters. *Molecules* **2009**, 14, 1762-1772.
11. a) Galland, S.; Mora, N.; Abert-Vian, M.; Rakotomanomana, N. and Dangles, O. Chemical Synthesis of Hydroxycinnamic Acid Glucosides and Evaluation of Their Ability To Stabilize Natural Colors via Anthocyanin Copigmentation. *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, 55, 7573-7579; b) Quideau, S.; Lamidey, A-M. and Pouysegu, L. Method of synthesising chicoric acid. FR2830251-A1, **2003**.
12. Kavitha, J., Rajasekhar, G., Subbaraju, G.V. and Ramesh, G.N. Synthesis of vinyl caffeate, an antioxidant from *Perilla frutescens* Britton var. *crispa* (Thunb.). *Indian Journal Chemistry* **1999**, 38B, 1280-1281.

13. a) Ilich, P. 7-Azaindole: the low-temperature near-UV/vis spectra and electronic structure *J. Molecular Structure* **1995**, 354, 37-47; b) Ingham, K. C. and El-Bayoumi, M. A. Photoinduced double proton transfer in a model hydrogen bonded base pair. Effects of temperature and deuterium substitution. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96 (6), 1674-1682; c) Matsui, K.; Matsuzuka, T. and Fujita, H. Fluorescence Spectra of 7-AzaIndole in the Sol-Gel-Xerogel Stages of Silica. *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 4991-4993; d) Chang, C.P.; Wen-Chi, H.; Meng-Shin, K.; Chou, P.T. and Clements, J. H. Acid Catalysis of Excited-State Double-Proton Transfer in 7-Azaindole. *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 8801.
14. a) Muñoz, M.A.; Galán, M.; Gómez, L.; Carmona, C; Guardado, P. and Balón, M. The pyrrole ring as hydrogen-bonding π -donor base: an experimental and theoretical study of the interactions of N-methylpyrrole with alcohols. *Chemical Physics* **2003**, 290 (1), 69-77; b) Katritzky, A.R.; Rees, C.W.; Bird, C.W. and Chessman, G.W.H. (Eds.) *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford (**1983**), p. 201.
15. a) Cavga, H. and Mazik, M. Molecular Recognition of N-Acetylneuraminic Acid with Acyclic Benzimidazolium- and Aminopyridine/guanidinium-Based Receptors. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (3), 831-838; b) Buthe, A. and Mazik, M. Highly effective receptors showing di- vs. monosaccharide preference. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6 (9), 1558-1568; c) Kuschel, M. and Mazik, M. Amide, Amino, Hydroxy and Aminopyridine Groups as Building Blocks for Carbohydrate Receptors. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 9, 1517-1526; d) Kuschel, M. and Mazik, M. Highly Effective Acyclic Carbohydrate Receptors Consisting of Aminopyridine, Imidazole, and Indole Recognition Units. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14 (8), 2405-2419; e) Buthe, A. and Mazik, M. Recognition properties of receptors based on dimesitylmethane-derived core: Di- vs. monosaccharide preference. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7 (10), 2063-2071.
16. Zyryanov, G. V., Palacios, M.A. and Anzenbacher, P. Rational Design of a Fluorescence-Turn-On Sensor Array for Phosphates in Blood Serum. *Angew. Chem.* **2007**, 41, 7849-7852.
17. Balde, P.B.; Gareiss, P.C. and Miller, B.L. Selective Recognition of Alkyl Pyranosides in Protic and Aprotic Solvents. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9566-9573.
18. a) Zhao, Z.G.; Im, J.S.; Lam, K.S. and Lake, D.F Site-Specific Modification of a Single-Chain Antibody Using a Novel Glyoxylyl-Based Labeling Reagent. *Bioconjugate Chem.*

- 1999**, 10, 424-430; b) Reina, J. J.; Maldonado, O. S.; Tabarini, G.; Fieschi, F. and Rojo, J. Mannose Glycoconjugates Functionalized at Positions 1 and 6. Binding Analysis to DC-SIGN Using Biosensors. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 963-969.
19. Balzarini, J.; Naesens, L.; Slachmuylders, J.; Niphuis, H.; Rosenberg, I.; Holy, A.; Schellenkens, H. and De Clercq, E. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *AIDS* **1991**, 5 (1), 21-28.
20. Beart, J.E.; Lilley, T.H. and Haslam, E. Polyphenol interactions. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid catalyzed decomposition: observation on some polymeric proanthocyanidins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1985**, 1439-1443.
21. Chen, Z.-Y.; Zhu, Q.Y.; Wong, Y.F.; Zhang, Z. and Chung, H.Y. Stabilizing effect of ascorbic acid on green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 2512-2516.
22. Homola, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 462-493.
23. McDonnell, J. M. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 572-577.
24. Cooper, M.A. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1 (7), 515-528.
25. Szabo, A., Stolz, L. and Granzow, R. Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5 (5), 699-705.
26. Lofas, S. and Johnsson, B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface-plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 21, 1526-1528.
27. Douat-Casassus, C.; Chassaing, S.; Di Primo, C. and Quideau, S. Specific or Nonspecific Protein-Polyphenol Interactions? Discrimination in Real Time by Surface Plasmon Resonance. *ChemBioChem* **2009**, 10, 2321-232.
28. Johnsson, B.; Löfås, S. and Lindquist, G. Immobilization of proteins to a Carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* **1991**, 198 (2), 268-277.

29. Tanabe-Tochikura, A.; Tochikura, T. S.; Yoshida, O.; Oki, T.; Yamamoto, N. Pradimicin-A inhibition of human-immunodeficiency virus-attenuation by mannan. *Virology* **1990**, 176, 467-473.
30. Balzarini, J.; Francois, K. O.; Van Laethem, K.; Hoorelbeke, B.; Renders, M.; Auwerx, J.; Liekens, S.; Oki, T.; Igarashi, Y. and Schols, D. Pradimicin S, a highly soluble nonpeptidic small-size carbohydrate-binding antibiotic, is an anti-HIV drug lead for both microbicidal and systemic use. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 1425-1435.
31. a) Gilbert, D.L. Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academic of Sciences* **2000**, 899 (1), 1-14; b) Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free radical in biology and Medicine* **1989**, 1, 142.
32. a) Cadenas, E. Biochemistry of oxygen-toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, **1989**, 58, 79-110; b) Inoue, M.; Sato, E.F.; Nishikawa, M.; Park, A.M.; Kira, Y.; Imada, I. and Utsumi, K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, **2003**, 10 (23), 2495-2505.
33. Harbone, J. Plant polyphenolics. In: Bell, E., Charlwood, B. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, **1980**, 329-395.
34. Frankel, E.N.; Finley, J.W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *J. of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56 (13), 4901-4908.
35. a) García-Lafuente, A.; Guillamón, E.; Villares, A.; Rostagno, M.A. and Martínez, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research* **2009**, 58 (9), 537-552; b) Butt, M.S.; Sultan, M.T. Green tea: nature's defense against malignancies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2009**, 49 (5), 463-473; c) Ramesh, B.N.; Rao, T.S.; Prakasam, A.; Sambamurti, K. and Rao, K.S. Neuronutrition and Alzheimer's disease. *The Journal of Alzheimer's Disease* **2010**, 19 (4), 1123-1139; d) Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition and Food Research* **2010**, 52 (5), 507-526; e) Weinreb, O.; Amit, T.; Mandel, S. and Youdim, M.B. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neuritogenic properties. *Genes and Nutrition* **2009**, 4 (4), 283-296.

36. Andreyev, A.Y.; Kushnareva, Y.E. and Starkov, A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* **2005**, 70, 200–214.
37. Ibáñez, F. C.; Torre, P. and Irigoyen, A. Aditivos Alimentarios. Universidad de Navarra. **2003**, 1-12.
38. a) Rivero-Pérez, M.D.; Muñiz, P. and González-Sanjosé, M.L. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46 (8), 2815-2822; b) Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V. and Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research* **2002**, 36 (2), 177-187.
39. Huang, D.; Ou, B. and Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 1841-1856.
40. MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G. and Garg, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci. Food. Agric.* **2006**, 86, 2046–2056.
41. Prior, R. L.; Wu, X. and Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (10), 4290-4302.
42. a) Tabarta, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J-O. and Dommese, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compound measured by various tests. *Food Chem.* **2009**, 113, 1226-1233; b) Floegel, A.; Kim, D-O.; Chung, S-J.; Koo, S. I. and Chun, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Composition and Analysis* **2011**, 24, 1043–1048.
43. a) Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V. and Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* **1993**, 84 (4), 407-412; b) Arnao, M.B.; Cano, A.; Hernández-Ruiz, J.; García-Cánovas, F. and Acosta, M. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Analytical Biochemistry* **1996**, 236 (2), 255-261; c) Cano, A.; Alcaraz, O.; Acosta, M. and Arnao, M.B. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{•+} assay. *Redox Report* **2002**, 7 (2), 103-109.

44. Miller, N.J.; Rice-Evans, C.A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} radical cation assay. *Free Radical Research* **1997**, 26 (3), 195-199.
45. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. and Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, 26 (9-10), 1231-1237.
46. Magalhaes, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S. and Lima, J.L.F.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* **2008**, 613 (1), 1-19.
47. von Gadow, A., Joubert, E. and Hansmann, C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45, 632-638.
48. Teshima, T., Matsumoto, T., Wakamiya, T., Shiba, T., Aramaki, Y., Nakajima, T. and Kawai, N. Total synthesis of nstx-3, spider toxin of nephila maculate. *Tetrahedron* **1991**, 47, 3305-3312.
49. Csáký, A., Martínez, M. A., Libro: Técnicas experimentales en síntesis orgánica. Editorial SINTESIS, España, **1998**.

Capítulo 2

Dendrímeros de triptófano: Síntesis y evaluación frente a la replicación de VIH-1 y VIH-2

Anteriormente al trabajo desarrollado en la presente Memoria, en nuestro grupo de investigación se habían preparado tres series de compuestos (monómeros, dímeros y trímeros) que poseían como elemento estructural común un anillo de trietilbenceno como esqueleto central al que se unen anillos de triazina sustituidos con aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) con su grupo ácido libre.^{1,2} Los mejores resultados de actividad se encontraron para los trímeros de fórmula general **I** (Figura 1). Estudios de relaciones estructura-actividad permitieron concluir que tanto el esqueleto central como la naturaleza de los aminoácidos en la periferia tenían un marcado efecto en la actividad así como en la capacidad de unión a gp120, siendo el compuesto **AL-195** (Figura 1), con seis residuos de triptófano en la periferia, el que presentó un mejor perfil de actividad-toxicidad ($EC_{50} = 16 \mu M$; $CC_{50} > 250 \mu M$) (Figura 1).^{1,2}

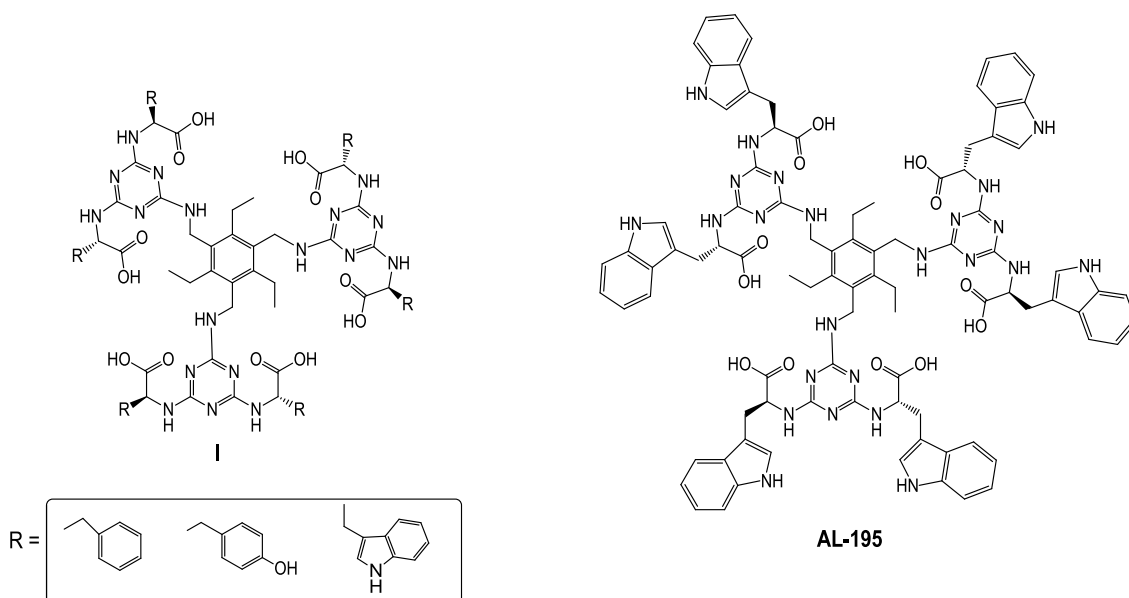


Figura 1. Fórmula general I de los trímeros y estructura del compuesto prototipo AL-195

Además en experimentos SPR, se demostró que dicho compuesto se une a la glicoproteína gp120 con una constante de afinidad ($K_d = 14 \mu M$). Los datos biológicos obtenidos, junto con los estudios de SPR, demuestran, por un lado la importancia del triptófano con su grupo ácido libre en la actividad biológica y por otro que la multivalencia, un aspecto importante en la interacción de las lectinas con los carbohidratos, desempeña un papel crucial tanto en la actividad como en la interacción con gp120.

El objetivo del trabajo que se describe en el presente capítulo es, por un lado determinar el papel del anillo de triazina en la actividad anti-VIH y por otro, obtener compuestos más potentes que el prototipo **AL-195**, para lo cual decidimos preparar análogos con más de 6 triptófanos en la periferia. La preparación de dichos compuestos requirió el desarrollo de herramientas sintéticas adecuadas que permitiesen anclar simultáneamente un número elevado de triptófanos sobre un esqueleto central siguiendo una estrategia similar a la empleada para la síntesis de dendrímeros.

Síntesis de dendrímeros

Los dendrímeros son moléculas altamente ramificadas con un tamaño uniforme y controlado y con elevada densidad de grupos funcionales en la periferia.

Los elementos estructurales necesarios para la preparación de dendrímeros son un núcleo o “core” de donde emergen las ramificaciones (nodos) que posibilitan la ramificación en un número de ramas determinado a las que se incorporan los grupos terminales (en nuestro caso triptófano) que son los que quedan expuestos en la superficie (Figura 2).

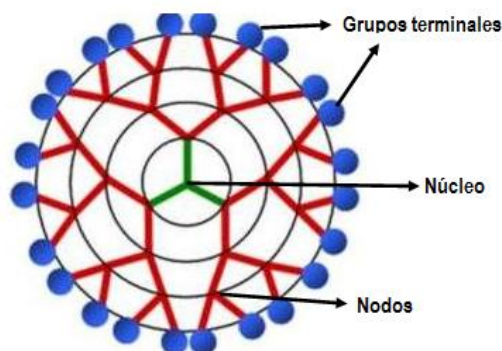


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de un dendrímero

Para la síntesis de dendrímeros es necesaria la elección de las unidades estructurales de construcción o monómeros, núcleo de crecimiento y una secuencia sintética cuya repetición permita el crecimiento. Los diferentes métodos de síntesis pueden englobarse dentro de dos grandes estrategias sintéticas generales: convergente y divergente.

En la estrategia **divergente**, desarrollada por Tomalia y colaboradores³, (Figura 3) el compuesto se construye desde el núcleo polifuncional seleccionado hacia la superficie. El núcleo se hace reaccionar con el correspondiente monómero y posteriormente se realiza la

activación de los grupos situados en la periferia. La repetición sucesiva de estos pasos conduce al crecimiento simultáneo de todas las ramas intermedias, dando lugar a las diferentes generaciones del dendrímero, en nuestro caso de molécula funcionalizada con triptófano. Esta estrategia funciona bien para la obtención de grandes cantidades de compuesto; sin embargo, a medida que hay más grupos funcionales en la periferia (dendrímeros de altas generaciones) es más probable que se produzcan defectos estructurales en el crecimiento, ya que al aumentar la generación, crece el número de enlaces covalentes que se han de formar en una única etapa sintética, lo que puede conducir a reacciones incompletas donde no todos los enlaces se han formado.

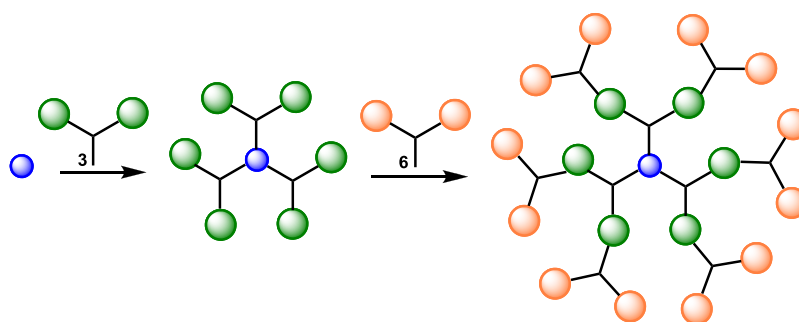


Figura 3. Representación esquemática de la estrategia divergente

La otra estrategia sintética, conocida como **convergente**, fue descrita por Fréchet y colaboradores⁴; en ella, el compuesto se construye desde la superficie hacia el núcleo. En primer lugar, se sintetiza cada rama dendrítica o dendrón, finalizando la síntesis con la unión de los dendrones a un núcleo polifuncional (Figura 4). El problema de esta estrategia reside en la última etapa, ya que dependiendo del núcleo y de la generación pueden existir impedimentos estéricos, sobre todo cuando los dendrones son de generaciones elevadas.

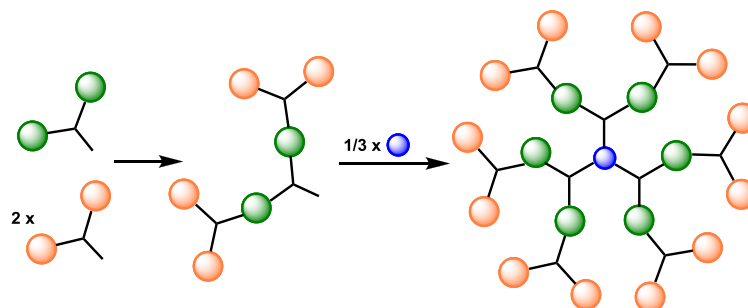


Figura 4. Representación esquemática de la estrategia convergente

DISCUSION DE RESULTADOS

Síntesis

En primer lugar se abordó la síntesis de los compuestos **1** y **2** (Figura 1), con 12 y 18 triptófanos respectivamente en la periferia. En ambos compuestos, al igual que en el prototipo **AL-195**, los triptófanos se unen al esqueleto central a través de residuos de triazina (ver recuadro Figura 1). Para la síntesis de **1** y **2** se empleó una estrategia convergente en la que los compuestos se construyeron desde la superficie hacia el núcleo polifuncional seleccionado.

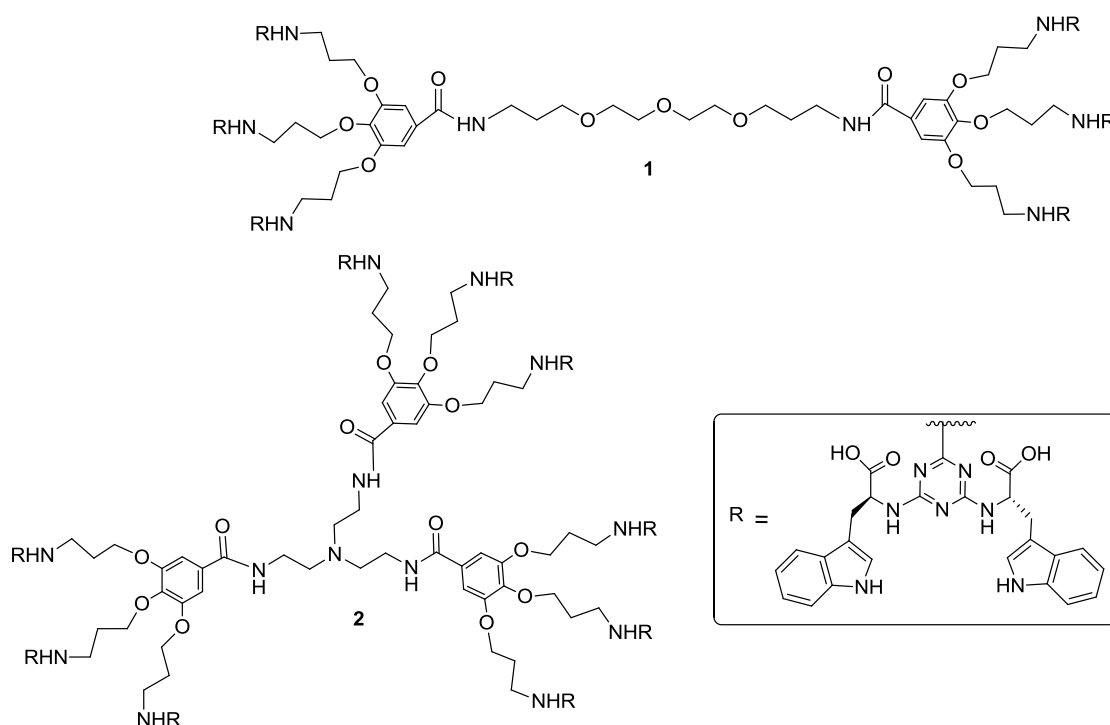
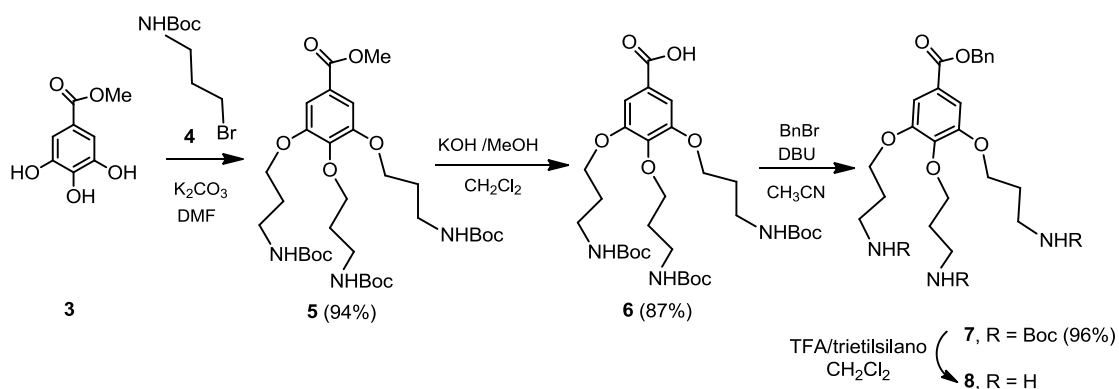


Figura 1. Estructura de los compuestos **1** y **2**

La síntesis de ambos compuestos comienza con la preparación del derivado de ácido gálico **8** siguiendo la ruta sintética que se muestra en el Esquema 1. En primer lugar el metil galato **3** se hace reaccionar en medio básico (K_2CO_3) con *N*-Boc-3-bromopropilamina **4** obteniéndose el O-alquil derivado **5**.⁵ La saponificación de **5** seguida de esterificación del ácido resultante **6**⁵ con alcohol bencílico conduce al compuesto **7** con un 96% de rendimiento. La desprotección en medio ácido (TFA) de los grupos protectores *tert*-butiloxycarbonilo (Boc) de los NH terminales presentes en **7**, conduce al bencil galato **8** con los extremos amino terminal desprotegidos, que será utilizado para el ensamblaje posterior del residuo de triazina.



Esquema 1. Síntesis del bencil galato 8

Por otra parte, llevamos a cabo la síntesis de la triazina disustituida con triptófano **10** (Esquema 2) empleando el método descrito por nuestro grupo de trabajo^{1,2} en el que se emplea cloruro cianúrico **9** como producto de partida.

Merece la pena destacar que el cloruro cianúrico (2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina), es un síntón barato y muy versátil, pues cada átomo de cloro presente en su estructura puede ser sustituido secuencialmente por diferentes nucleófilos controlando la temperatura (Figura 2).

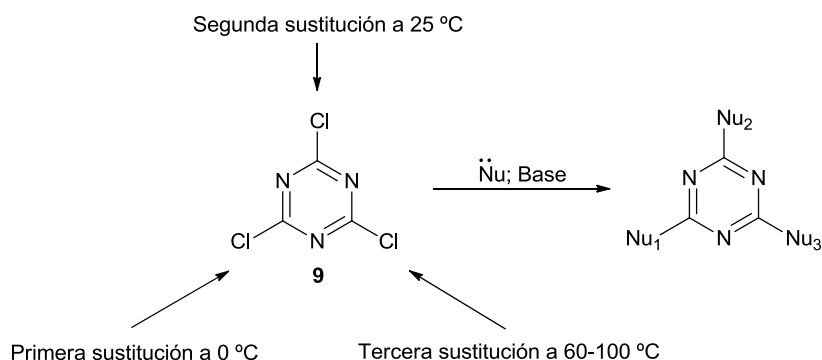
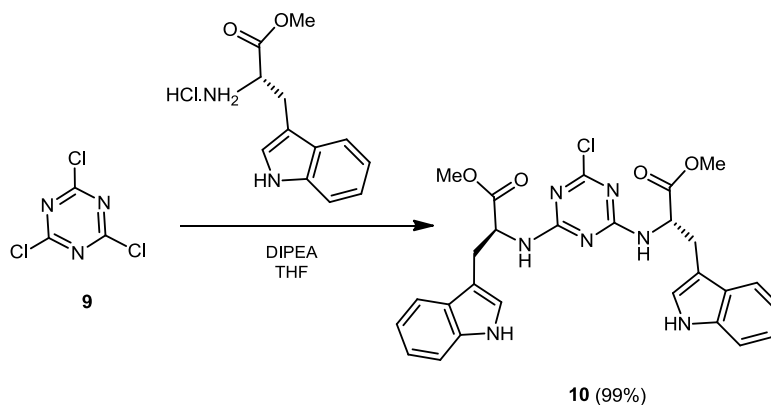


Figura 2. Temperaturas necesarias para las diferentes sustituciones nucleófilas en el anillo de triazina

La primera sustitución es exotérmica y se realiza a 0 °C; en estas condiciones no se observan productos de disustitución, pues el anillo de triazina queda desactivado por la introducción del primer nucleófilo. La incorporación del segundo nucleófilo, o la sustitución simultánea de dos átomos de cloro con el mismo nucleófilo, se realiza a temperatura ambiente. El anillo de triazina con dos sustituyentes se encuentra altamente desactivado, por lo que la tercera sustitución sólo tiene lugar con calor, aplicando temperaturas entre 60 y 100 °C, dependiendo de la reactividad del nucleófilo, y requiere además tiempos prolongados de reacción, entre 24 y 48 horas. Por ello, en nuestro grupo de trabajo, la síntesis asistida por

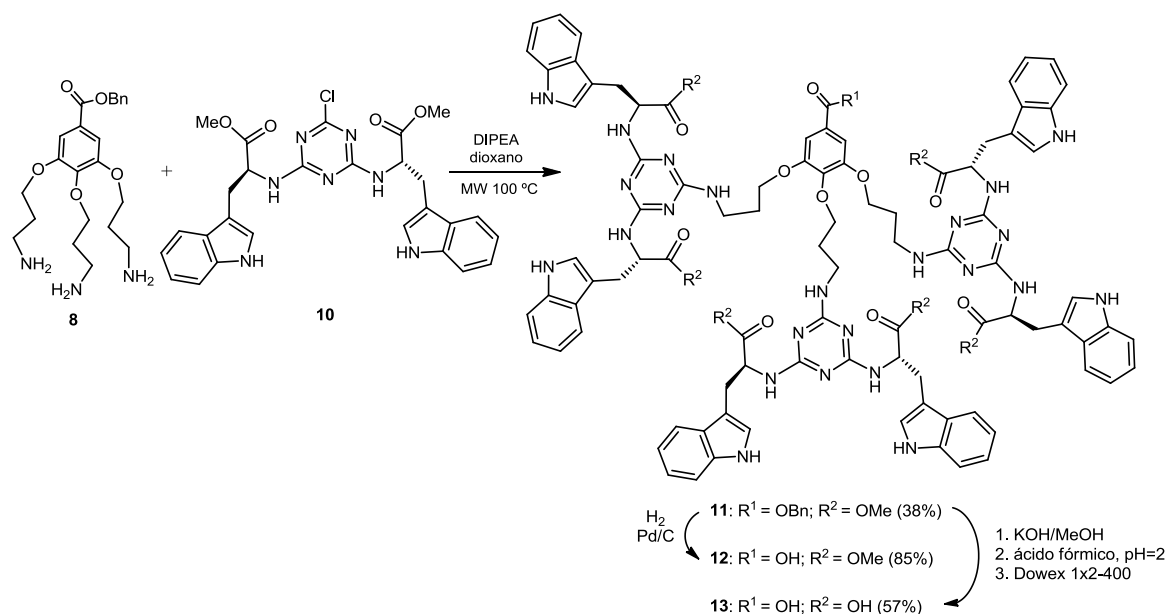
microondas se puso a punto para realizar la sustitución nucleófila del tercer cloro del anillo de triazina^{2,6}.

En nuestro caso, el cloruro cianúrico (**9**) se hizo reaccionar en presencia de DIPEA con 2 equivalentes de H-Trp-OMe.HCl a temperatura ambiente para obtener el compuesto deseado **10** con elevado rendimiento (99%) (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de la triazina disustituída 10

A continuación, la reacción del bencil galato **8** con la triazina disustituída con triptófano **10** condujo al bencil galato **11** con un 38% de rendimiento (Esquema 3). En dicha reacción resultó clave tanto el empleo de DIPEA como base como de microondas (100 °C, 400 W potencia máxima). La hidrogenación catalítica de **11** condujo al compuesto **12** (85%), que contiene un ácido carboxílico en el punto focal, que sería utilizado para la unión a los esqueletos centrales.



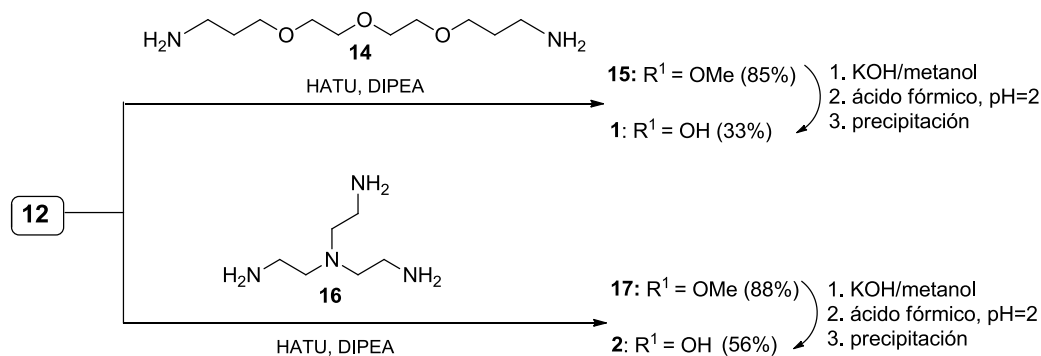
Esquema 3. Síntesis de los compuestos 11-13

Por otra parte y dado que el compuesto **11** posee, al igual que el compuesto prototipo **AL-195**, seis triptófanos en la periferia consideramos de interés llevar a cabo su ensayo biológico para lo cual fue necesaria la desprotección de todos los ésteres carboxílicos presentes en la molécula. Para ello, el compuesto **11** se trató con KOH/metanol durante toda la noche adicionándose posteriormente ácido fórmico al medio de reacción hasta pH 2. Puesto que el compuesto **13** con todos sus grupos ácidos desprotegidos constituía nuestro objetivo, era necesario disponer de un método versátil que permitiera el correcto aislamiento de dicho compuesto. En este sentido, Bookser y Zhu⁷ habían realizado un estudio exhaustivo empleando distintas resinas de intercambio aniónico en forma formiato y una amplia variedad de disolventes para la captura y/o aislamiento de ácidos carboxílicos aromáticos y alifáticos.

Aplicando dicho método de purificación al bruto de reacción obtenido tras la saponificación del éster **11**, se pudo aislar el producto **13** con un rendimiento del 57% (Esquema 3). Este producto con todos sus grupos ácidos carboxílicos desprotegidos se incluyó en los ensayos biológicos.

Una vez sintetizado el compuesto **12**, con un grupo carboxílico en su punto focal, decidimos abordar la síntesis de los compuestos finales **1** y **2** tal y como se muestra en el esquema 4, para lo cual se llevó a cabo la reacción de **12** con las aminas comerciales **14** y **16** en presencia de HATU y DIPEA, obteniéndose **15** y **17** con rendimientos del 85% y 88%

respectivamente. Cuando se empleó resina Dowex para purificar el bruto de reacción obtenido tras la saponificación de **15** y **17**, se aislaron los compuestos **1** y **2** con rendimientos muy bajos, por lo que decidimos repetir la reacción y purificar el bruto de reacción mediante precipitación, aislándose los compuestos **1** y **2** con un 33% y 56% de rendimiento respectivamente.



Esquema 4. Síntesis de los compuestos **1** y **2**

El análisis por espectrometría de masas de los compuestos **1** (Figura 3) y **2** (Figura 4) se realizó mediante la técnica MALDI-TOF. Las mejores condiciones para registrar los espectros de ambos compuestos fueron las siguientes: el producto se disolvió en DMSO y se usó el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) como matriz. Como puede observarse en la figura 3, el espectro del compuesto **1** muestra un pico a m/z 3768.3 que está de acuerdo con la presencia de 12 unidades de triptófano en la periferia.

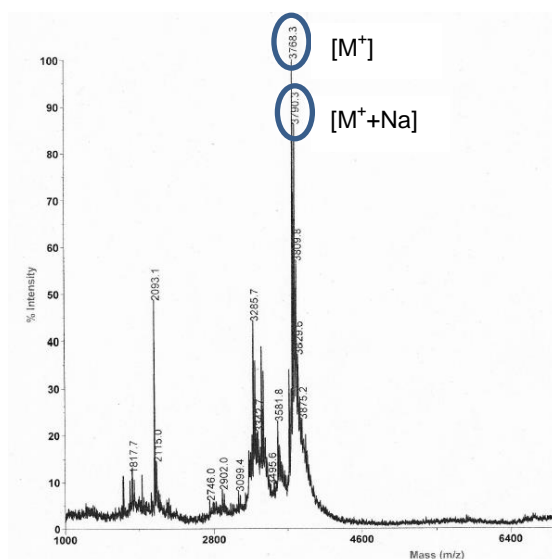


Figura 3. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **1**

Para el compuesto **2** se puede observar el pico a m/z 5467.0 que corrobora la presencia de 18 unidades de triptófano en la periferia.

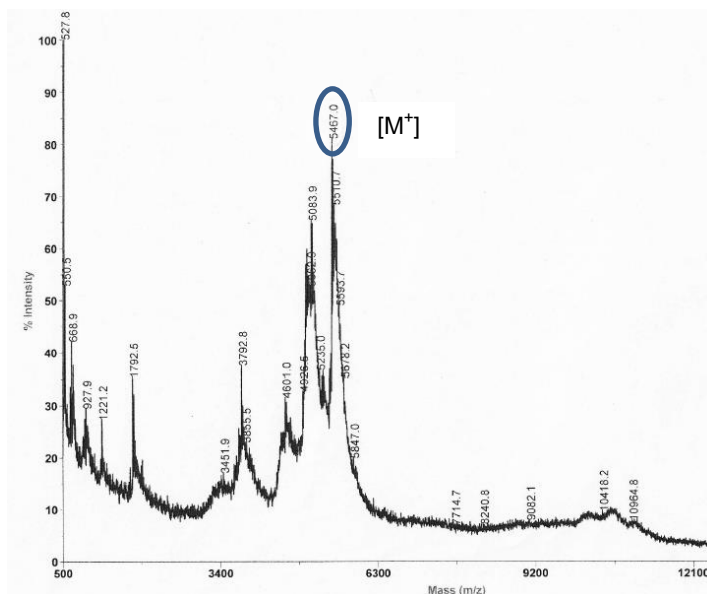
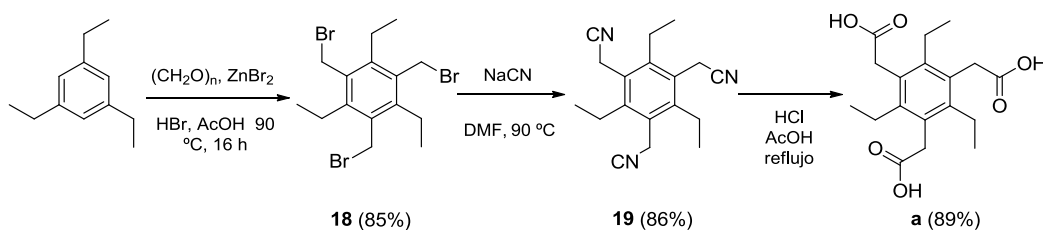


Figura 4. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **2**

Para determinar si el anillo de triazina juega un papel importante en la actividad decidimos preparar una segunda serie de compuestos en la que dicho anillo no estaba presente.

En primer lugar preparamos el compuesto **21**, un análogo de **AL-195** (Esquema 6) con un esqueleto central de trietilbenceno y tres residuos de triptófano en la periferia.

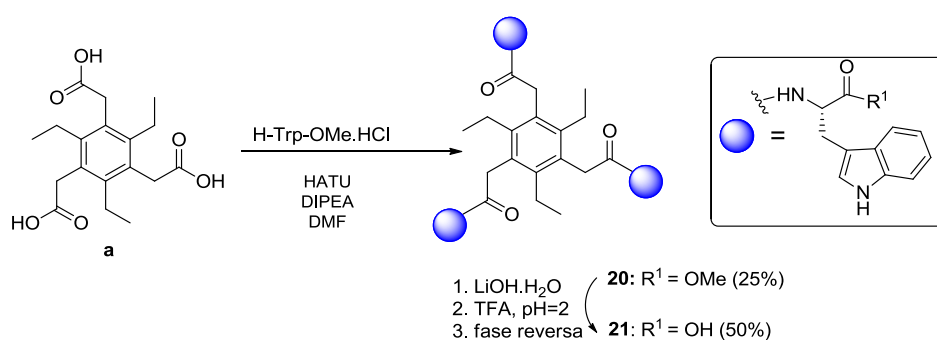


Esquema 5. Síntesis del triácido **a**

La síntesis de dicho compuesto comienza con la preparación del tris(carboximetil) derivado **a** (Esquema 5) siguiendo un procedimiento descrito en la bibliografía.⁸ En primer lugar se hace reaccionar el trietilbenceno con paraformaldehído en presencia de bromo para obtener el bromo derivado **18**. El tratamiento de **18** con cianuro sódico condujo al ciano derivado **19** cuya posterior hidrólisis con una mezcla (1:1) de ácido clorhídrico concentrado y ácido acético glacial permite obtener el compuesto deseado **a** con buen rendimiento (89%).

Merece la pena destacar que el grado de acidez del ácido acético resultó clave para la reacción, ya que cuando se emplearon ácidos acéticos con mayor contenido en agua, y por lo tanto menor grado de acidez, la reacción no tuvo lugar.

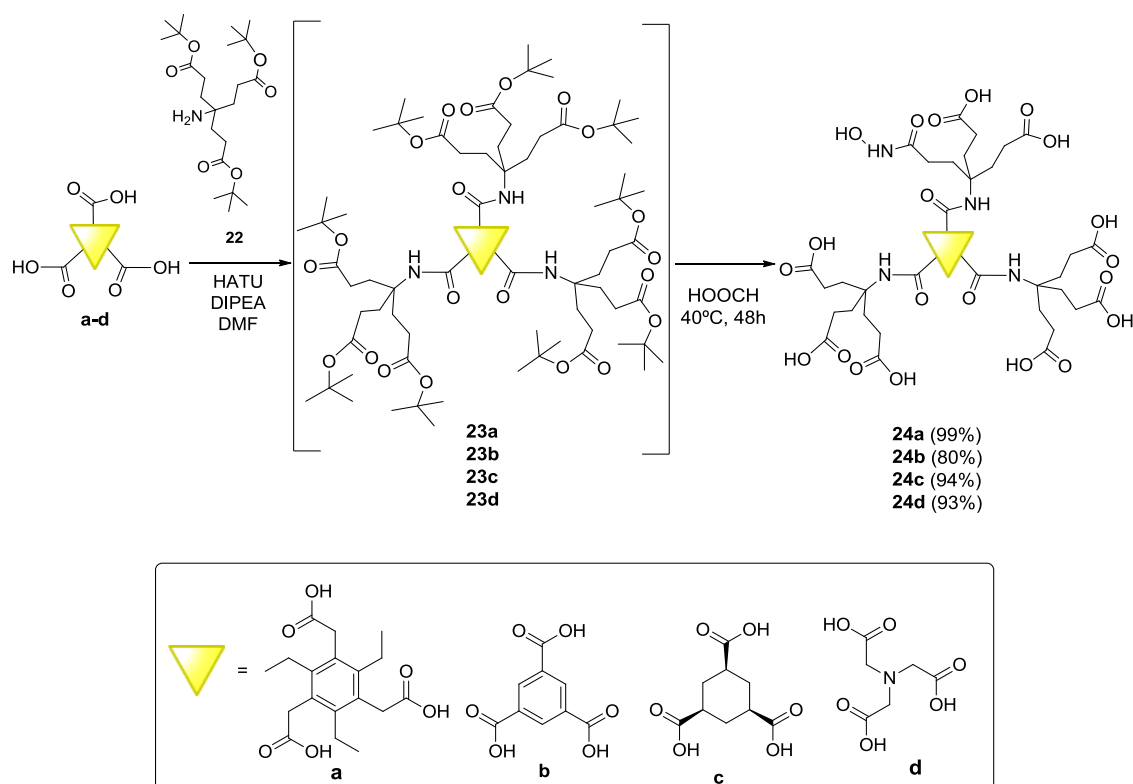
A partir del ácido 1,3,5-tris(carboximetil)-2,4,6-trietilbenceno **a** y mediante reacción con H-Trp-OMe.HCl en presencia de HATU y DIPEA se obtuvo el compuesto **20** con un rendimiento del 25% (Esquema 6). La desprotección de los ésteres metílicos presentes en **20** mediante tratamiento básico con LiOH.H₂O seguido de neutralización del medio de reacción con ácido trifluoroacético y purificación del bruto de reacción en cromatografía de fase reversa condujo al derivado **21** con un 50% de rendimiento.



Esquema 6. Síntesis del compuesto 21

Seguidamente abordamos la síntesis de los compuestos **24a-d** con 9 unidades de triptófano en la periferia y distintos esqueletos centrales capaces de orientar dichos residuos de manera diferente en el espacio. Para ello se emplearon los triácidos **a-d** con distintos grados de restricción conformational, siendo ésta mínima para el compuesto **d**, donde los grupos ácidos están anclados sobre una cadena flexible, y máxima para **b**, donde los residuos van anclados sobre un anillo de benceno rígido (Esquema 7). En esta síntesis resultó clave el empleo del dendrón aminotriéster **22** (Esquema 7) como unidad de crecimiento. Dicho dendrón, denominado también amina de Behera, ha sido muy utilizado como estructura amplificadora para la preparación de distintos dendrímeros.^{8,9,10}

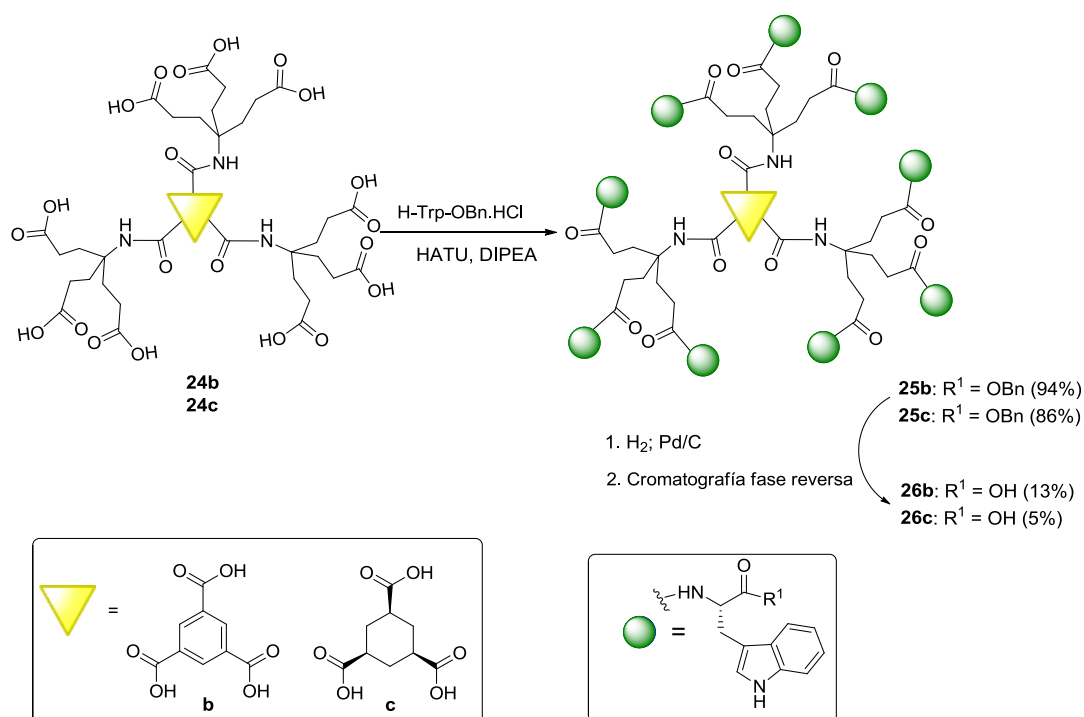
Así, la reacción de los ácidos **a-d** con el dendrón aminotriéster comercial **22** en presencia de HATU y DIPEA condujo a los compuestos **23a-d** cuya desprotección empleando ácido fórmico condujo a los nonaácidos **24a-d** con excelente rendimiento (80% - 93%) (Esquema 7).



Esquema 7. Síntesis de los compuestos 24a-d

La purificación de **24a-d** se llevó a cabo por precipitación empleando metanol/acetato de etilo sin necesidad de purificar previamente los intermedios **23a-d** protegidos con *tert*-butilo, lo que supone un gran ahorro tanto de tiempo como económico.

El posterior acoplamiento de **24b** y **24c** con H-Trp-OBn.HCl en presencia de HATU y DIPEA condujo a los compuestos **25b** (94%) y **25c** (86%) cuya desprotección mediante hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C (Esquema 8), dio lugar a los compuestos deseados **26b** (13%) y **26c** (5%) aunque con bajo rendimiento, por lo que para la síntesis de los compuestos restantes **26a** y **26d** decidimos emplear el triptófano protegido en forma de éster metílico.



La monodispersidad de los compuestos **26b** (Figura 5) y **26c** (Figura 6) se confirmó mediante espectrometría de masas. En los espectros de masas ESI en modo negativo se pudieron observar las señales correspondientes únicamente a los productos deseados. Estas señales indican claramente la entrada de 9 unidades de triptófano en ambos casos.

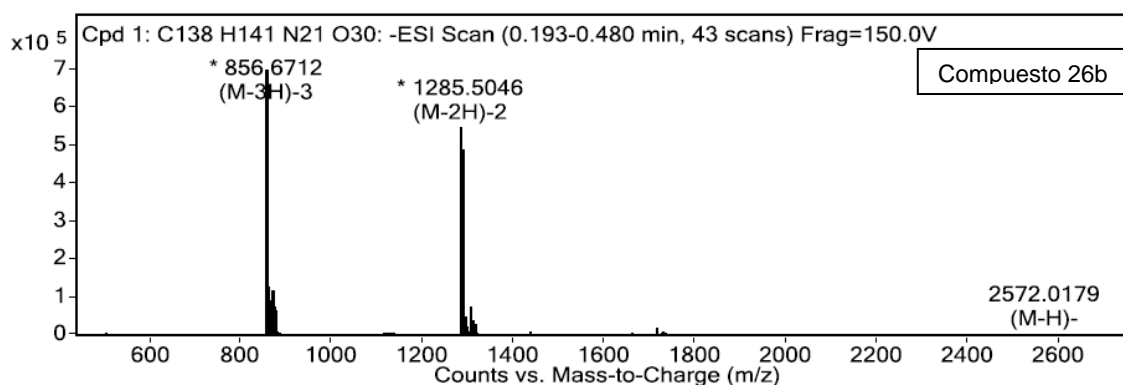


Figura 5. Espectro de masas ESI del compuesto 26b

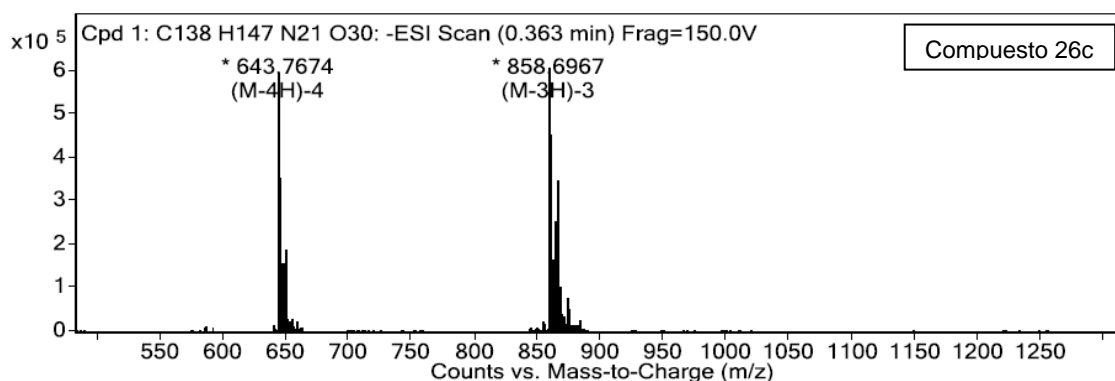
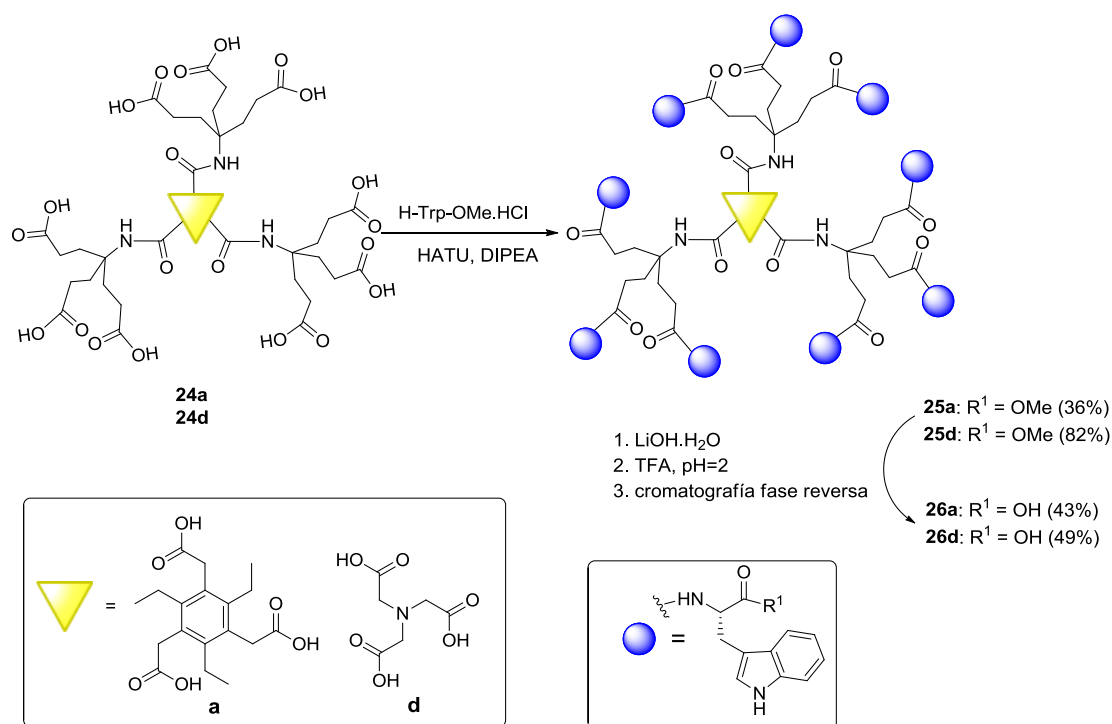


Figura 6. Espectro de masas ESI del compuesto 26c

Los compuestos, **26a** y **26d**, se obtuvieron con un 43% y un 49% de rendimiento respectivamente, mediante el acoplamiento de los ácidos **24a** y **24d** con H-Trp-OMe.HCl en presencia de HATU y DIPEA seguido de desprotección de los ésteres metílicos, presentes en **25a** y **25d**, mediante tratamiento básico con LiOH.H₂O, neutralización con ácido trifluoroacético y purificación por cromatografía de fase reversa (Esquema 9).



Esquema 9. Síntesis de los compuestos 26a y 26c

La monodispersidad de los compuestos **26a** (Figura 7) y **26d** (Figura 8) se confirmó mediante espectrometría de masas. En los espectros de masas ESI en modo negativo se

podieron observar las señales correspondientes únicamente a los productos deseados. Estas señales indican claramente la presencia de 9 unidades de triptófano en ambos casos.

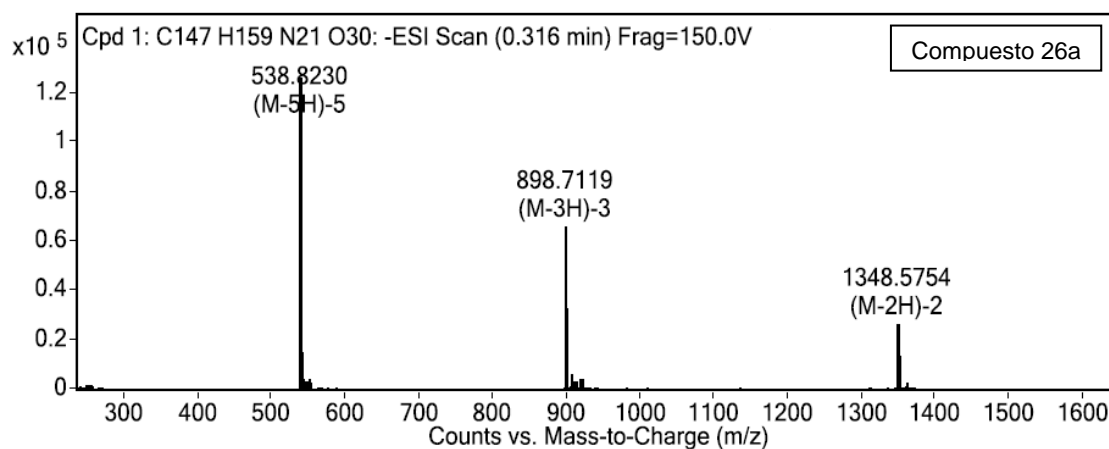


Figura 7. Espectro de masas ESI del compuesto 26a

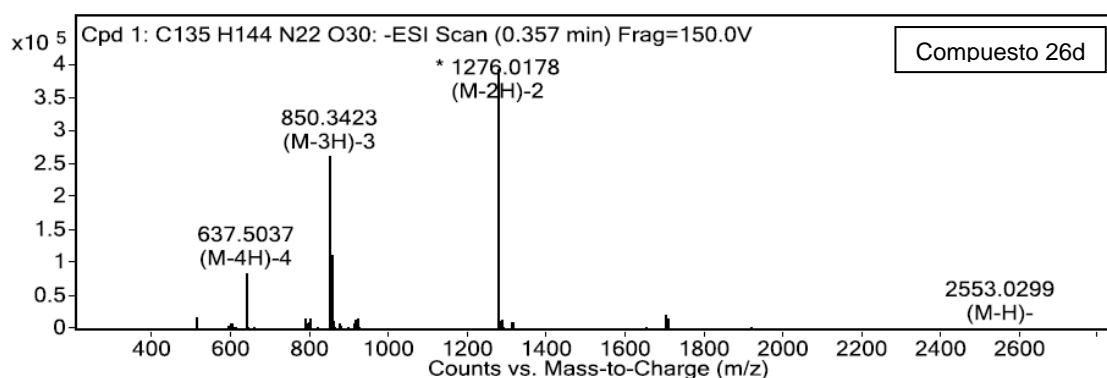
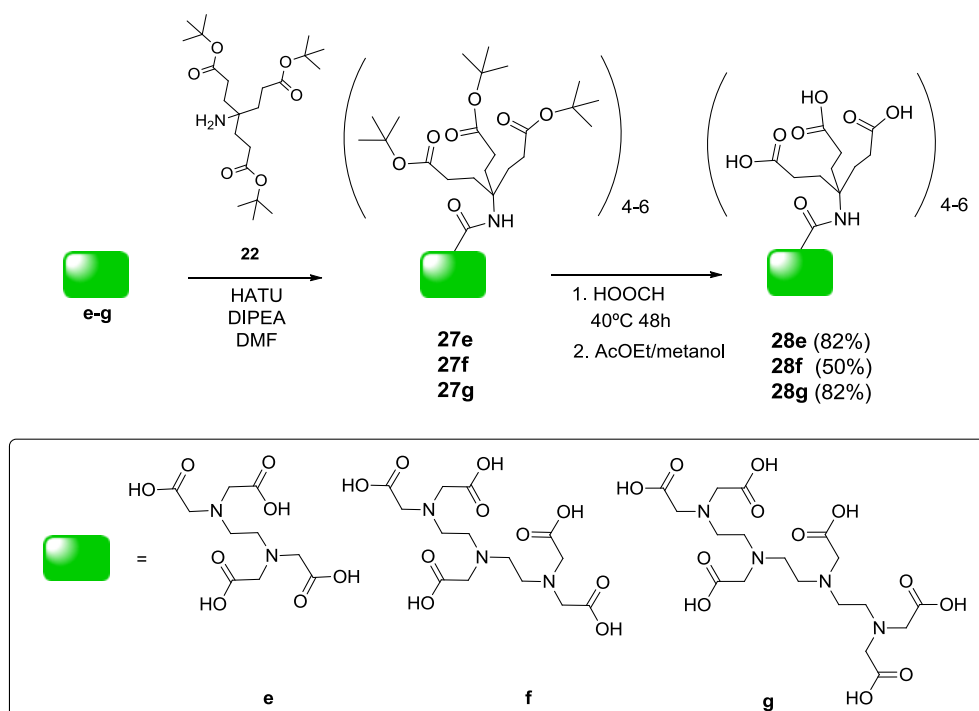


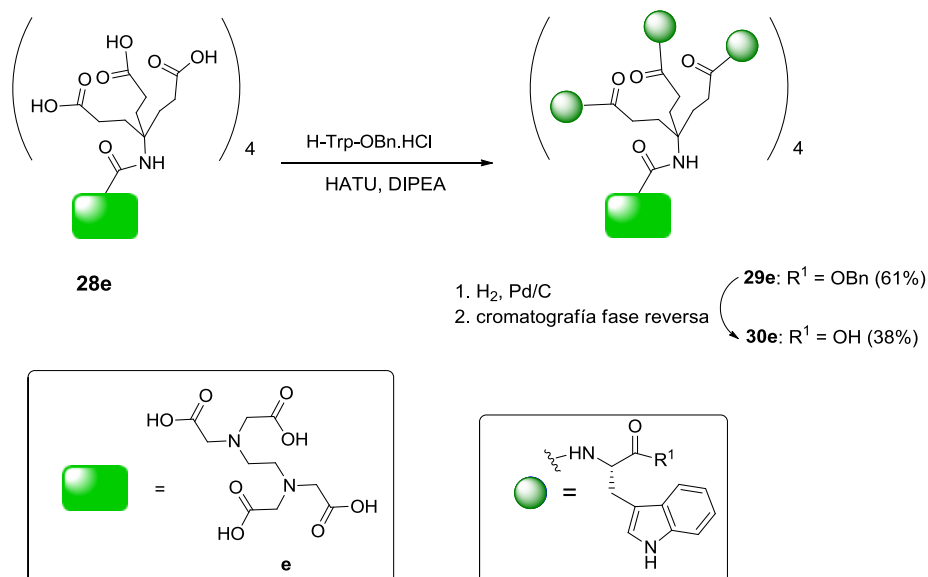
Figura 8. Espectro de masas ESI del compuesto 26d

La síntesis de los compuestos con 12, 15 y 18 triptófanos en la periferia se llevó a cabo siguiendo una secuencia de reacción similar a la empleada con anterioridad para los compuestos con 9 triptófanos. En este caso se emplearon los ácidos comerciales **e-g** con 4, 5 y 6 ácidos carboxílicos respectivamente, anclados sobre esqueletos flexibles (Esquema 10). La reacción de dichos ácidos con el dendrón aminotriéster **22** en presencia de HATU y DIPEA condujo a los terc-butilésteres **27e-g** cuyo tratamiento con ácido fórmico a 40°C durante dos días, seguido de precipitación con metanol/acetato de etilo condujo a los poliácidos **28e-g** con buen rendimiento (50% - 82%) (Esquema 10).



Esquema 10. Síntesis de los compuestos **28e-g**

El tratamiento de **28e** con H-Trp-OBn.HCl en presencia de HATU y DIPEA condujo a **29e** (61%) cuya desprotección mediante hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C dio lugar al compuesto deseado **30e** (38%) (Esquema 11).



Esquema 11. Síntesis del compuesto **30e**

La monodispersidad del compuesto **30e** (Figura 9) se confirmó mediante espectrometría de masas. En el espectro de masas ESI en modo negativo se pudo observar

una señal correspondiente únicamente al producto deseado. Esta señal indica claramente la entrada de 12 unidades de triptófano.

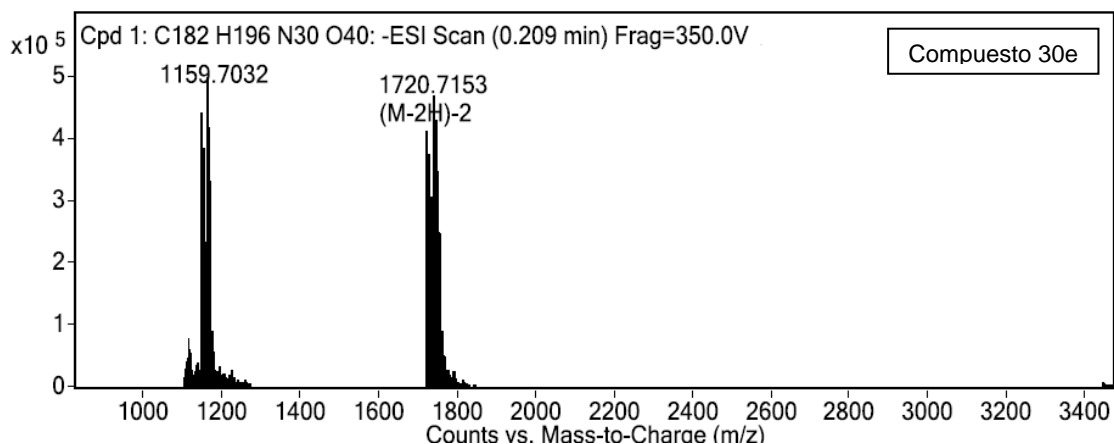
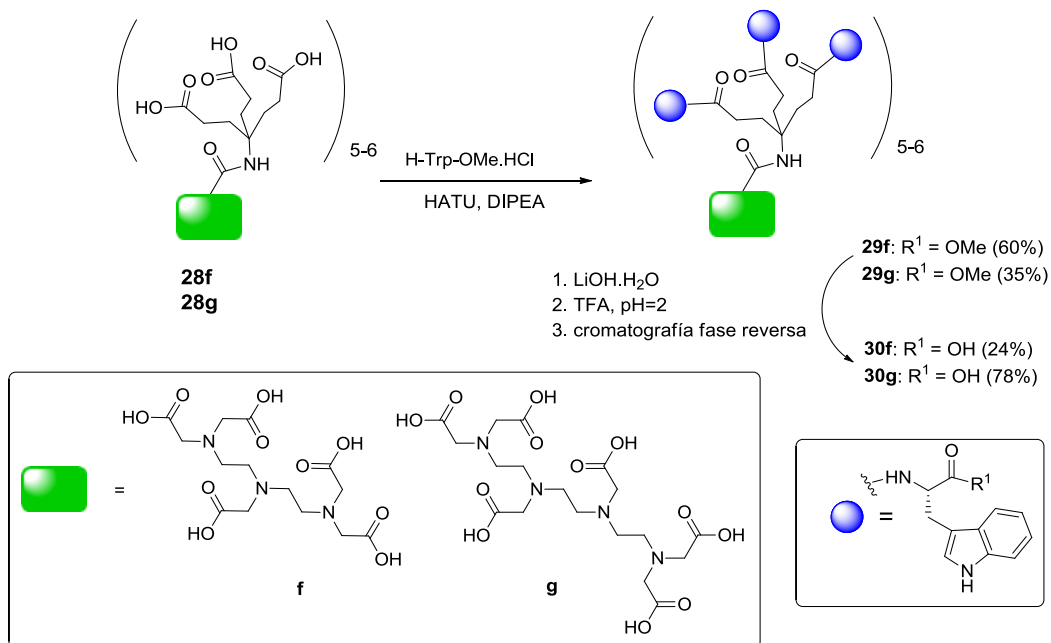


Figura 9. Espectro de masas ESI del compuesto 30e

Por otra parte, el tratamiento de **28f** y **28g** con H-Trp-OMe.HCl condujo a **29f** (60%) y **29g** (35%) respectivamente. La desprotección de los ésteres metílicos presentes en estos dos compuestos empleando LiOH.H₂O seguido de neutralización con ácido trifluoroacético y purificación mediante cromatografía de media presión en fase reversa condujo a los compuestos **30f** (24%) y **30g** (78%) (Esquema 12).



Esquema 12. Síntesis de los compuestos 30f y 30g

La monodispersidad de los compuestos **30f** (Figura 10) y **30g** (Figura 11) se confirmó mediante espectrometría de masas. En los espectros de masas ESI en modo negativo se pudieron observar las señales correspondientes únicamente a los productos deseados. Estas señales indican claramente la entrada de 15 y 18 unidades de triptófano respectivamente.

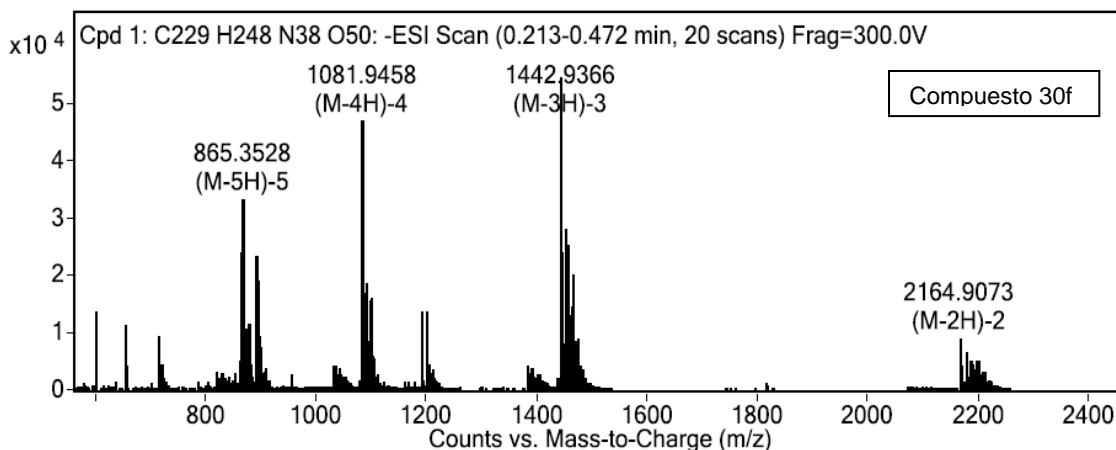


Figura 10. Espectro de masas ESI del compuesto 30f

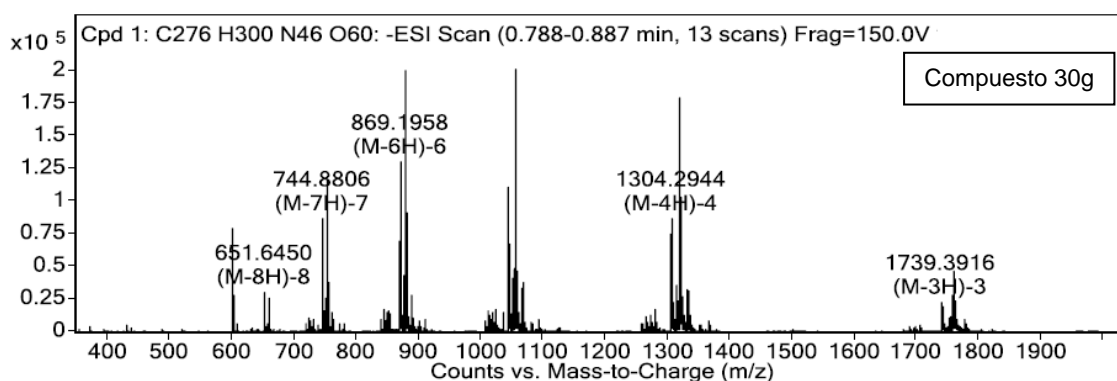
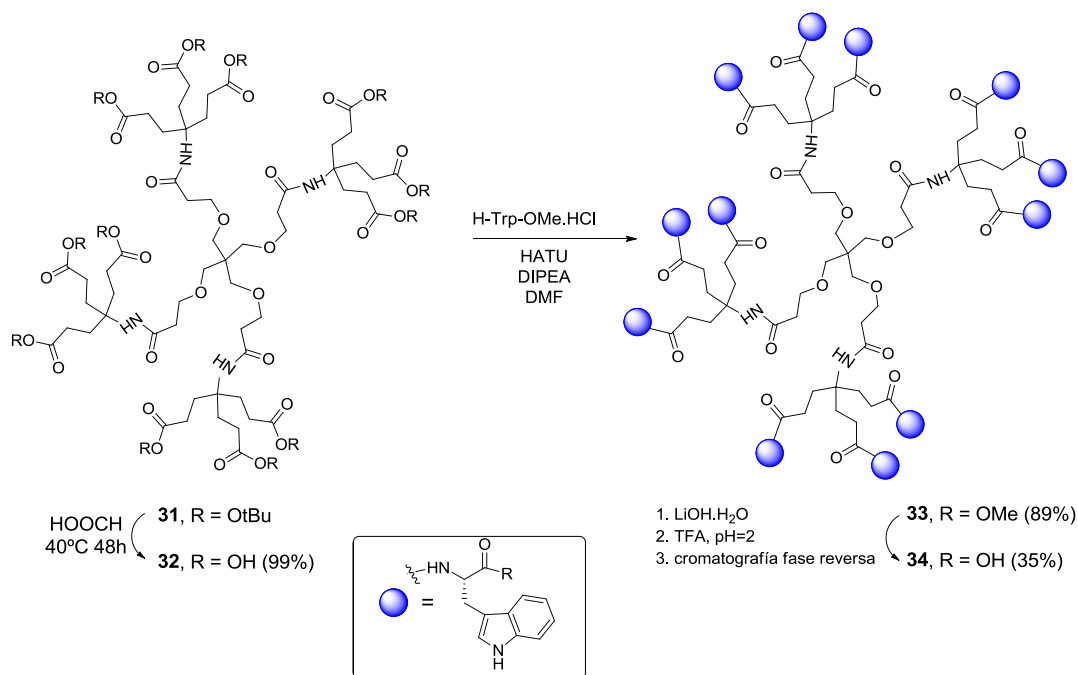


Figura 11. Espectro de masas ESI del compuesto 30g

Para profundizar en el estudio de relaciones estructura-actividad decidimos preparar el derivado de pentaeritritol **34** con 12 triptófanos en la periferia (Esquema 13). La comparación de los datos de actividad obtenidos para dicho compuesto y el compuesto **30e** (Esquema 11), también con 12 triptófanos en la periferia pero con un esqueleto central de EDTA, nos permitiría determinar el papel del esqueleto central en la actividad.

La síntesis de **34** se llevó a cabo a partir del compuesto comercial **31**, que ya lleva incorporadas cuatro unidades de dendrón aminotriéster sobre un esqueleto de pentaeritritol

(Esquema 13). La desprotección de **31** con ácido fórmico condujo al compuesto **32**¹⁰, que se aisló por precipitación con un 99% de rendimiento. El acoplamiento de **32** con H-Trp-OMe.HCl en presencia de HATU y DIPEA condujo al compuesto **33** con un 89% de rendimiento. La desprotección de los ésteres metílicos presentes en **33** mediante tratamiento básico con LiOH.H₂O seguido de tratamiento con ácido trifluoroacético y purificación por cromatografía de media presión en fase reversa condujo al ácido **34** con un 35% de rendimiento (Esquema 13).



Esquema 13. Síntesis del compuesto **34**

La monodispersidad del compuesto **34** (Figura 12) se confirmó mediante espectrometría de masas. En el espectro de masas ESI en modo negativo se pudieron observar las señales correspondientes únicamente al producto deseado.

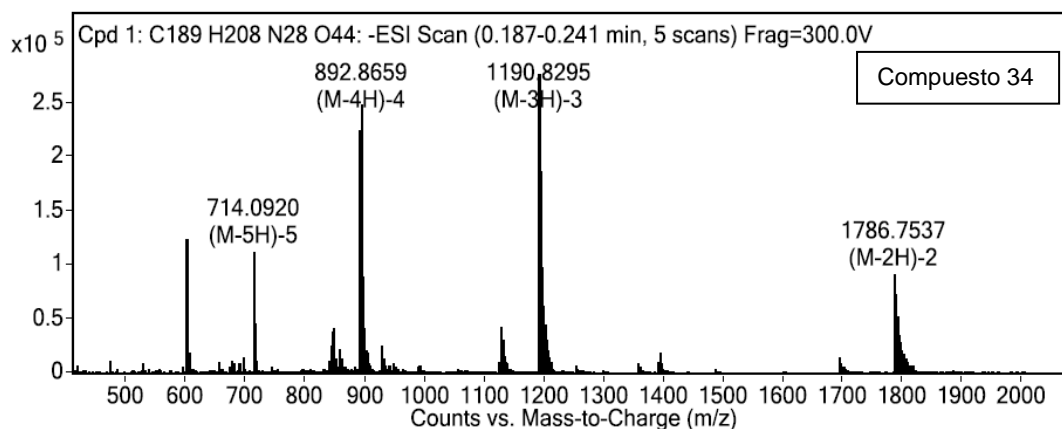
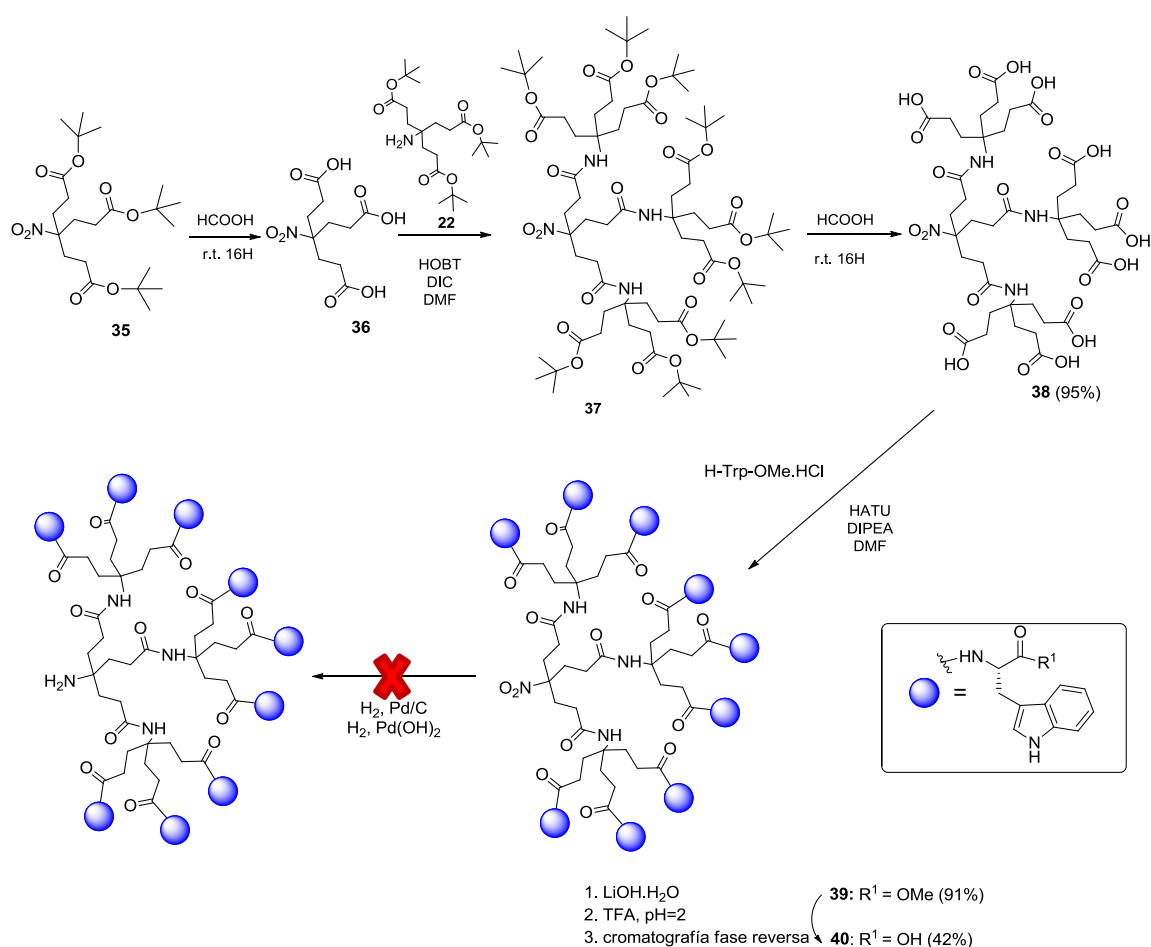


Figura 12. Espectro de masas ESI del compuesto **34**

Por último y con idea de sintetizar compuestos con un mayor número de triptófanos en la periferia decidimos preparar el dendrón **40** con nueve triptófanos en la periferia (Esquema 14). Para ello se empleó el nitrotriéster comercial **35** como compuesto de partida. La desprotección de **35** con ácido fórmico a temperatura ambiente condujo tras precipitación, al compuesto **36**¹¹ con un 98 % de rendimiento. La posterior reacción de **36** con el aminotriéster comercial **22** condujo al dendrón **37** cuya desprotección con ácido fórmico seguido de precipitación dio lugar al compuesto **38**¹¹ con un 95% de rendimiento. El acoplamiento de **38** con H-Trp-OMe.HCl en presencia de HATU y DIPEA condujo al dendrón deseado **39** (91%).

La reducción del grupo NO₂, presente en **39**, a NH₂ conduciría al correspondiente amino dendrón que sería empleado para la unión a diferentes núcleos polifuncionales portadores de grupos ácidos. Para llevar a cabo la reducción del grupo NO₂ empleamos Pd/C y Pd(OH)₂, pero en ambos casos los resultados fueron infructuosos. Por otra parte y dado que el dendrón **39** tiene nueve triptófanos en la periferia consideramos de interés llevar a cabo su ensayo biológico para lo cual fue necesaria la desprotección de los residuos de triptófano. Dicha desprotección se llevó a cabo mediante tratamiento básico de **39** con LiOH.H₂O, obteniéndose tras acidificación con TFA y purificación por cromatografía de fase reversa el compuesto desprotegido **40** con un 42% de rendimiento (Esquema 14) que se incluyó en los ensayos biológicos.



Esquema 14. Síntesis del dendrón 40

Al igual que en los casos anteriores, la monodispersidad del compuesto **40** (Figura 13) se confirmó mediante espectrometría de masas.

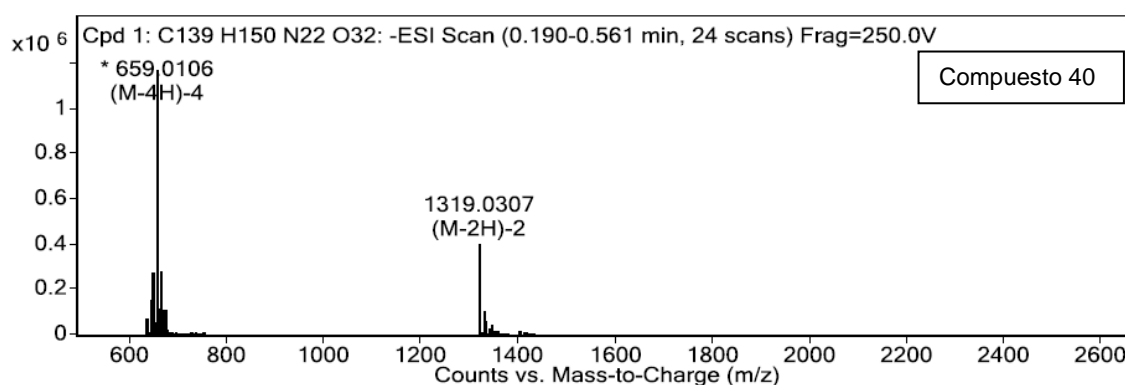
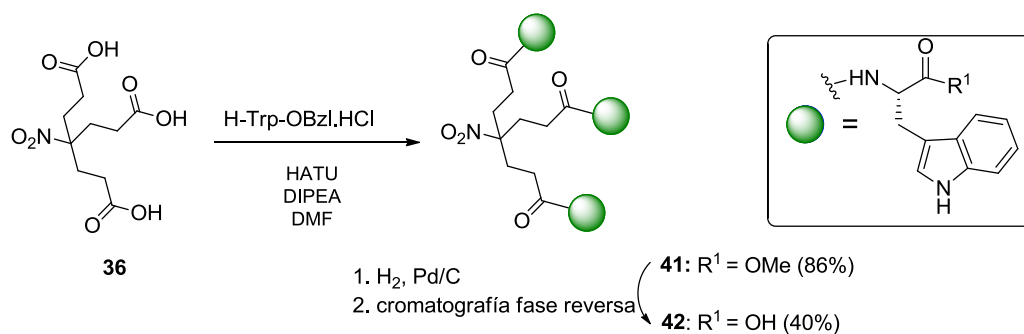


Figura 13. Espectro de masas ESI del compuesto 40

Por último, para completar el estudio de relaciones estructura-actividad, decidimos preparar el dendrón **42** con tan solo 3 triptófanos en la periferia. Para ello se empleó el

nitrotriéster comercial **36** como compuesto de partida. El acoplamiento de **36** con H-Trp-OBzl.HCl en presencia de HATU y DIPEA condujo a **41** (86%) cuya desprotección mediante hidrogenación catalítica en presencia de Pd/C dio lugar al compuesto deseado **42** (50%) (Esquema 15).



Esquema 15. Síntesis del dendrón 42

Desde el punto de vista sintético, a la vista de los resultados obtenidos, se podría concluir que en general, la desprotección de los ésteres metílicos transcurrió con mejores rendimientos que la de los ésteres bencílicos. Por otra parte, la mejor forma de purificar los compuestos finales, con un elevado número de ácidos carboxílicos libres, es mediante cromatografía de media presión (HPFC) en fase reversa.

Evaluación de los compuestos sintetizados frente a la replicación de los virus VIH-1 y VIH-2 en cultivo celular

Los compuestos preparados dentro del presente capítulo fueron evaluados frente a la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2), en cultivo celular empleando la línea celular CEM/0, siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el capítulo 1.

Los resultados de la evaluación biológica de los compuestos sintetizados quedan recogidos en la tabla 1. En ella, a efectos comparativos, se ha incluido el prototipo **AL-195**.

El primer dato que merece la pena destacar es que los poliácidos “desnudos” (con grupos ácidos y ausencia de triptófanos en la periferia) **24a**, **24c** y **28e** resultaron inactivos, mientras que cuando sobre dichos compuestos se anclan triptófanos los compuestos resultantes (**26a**, **26c** y **30e**) fueron activos. Este hecho experimental demuestra que la presencia de triptófano en la periferia es importante para la actividad anti-HIV.

Todos los compuestos de la primera serie (**1**, **2**, **13**), con anillos de triazina en su estructura resultaron activos. Entre ellos, el dendrón **13**, con 6 residuos de triptófano en la periferia, fue el menos activo, siendo su actividad 2,2 veces menor que la del prototipo **AL-195**. Sin embargo, el compuesto **1**, con 12 triptófanos en la periferia, posee una actividad similar a la del prototipo, mientras que el compuesto **2**, con 18 triptófanos, resultó 16 veces más activo que éste, siendo hasta el momento el compuesto más activo de la serie.

Todos los compuestos de la segunda serie, sin anillos de triazina en su estructura (**26a-d**, **30e-g**, **34** y **40**), mostraron actividad anti-VIH, resultando incluso más activos que el prototipo **AL-195**.

Dentro de esta segunda serie, los compuestos **26b-d**, **30f** y **34** resultaron los más activos, siendo su actividad muy similar ($EC_{50} = 1.2 - 3 \mu M$) mientras que **26c** resultó el menos tóxico ($CC_{50} > 250 \mu M$). Este último compuesto es el que presenta el mejor perfil de actividad/toxicidad ($CC_{50}/EC_{50} = 125$) de las dos series.

Por otra parte, el hecho de que el compuesto **21**, con un anillo central de trietilbenceno, así como el dendrón **42**, con tan solo 3 triptófanos en la periferia, resultasen inactivos, mientras que sus respectivos homólogos superiores **26a** y **40**, con 9 triptófanos en la periferia, sí lo

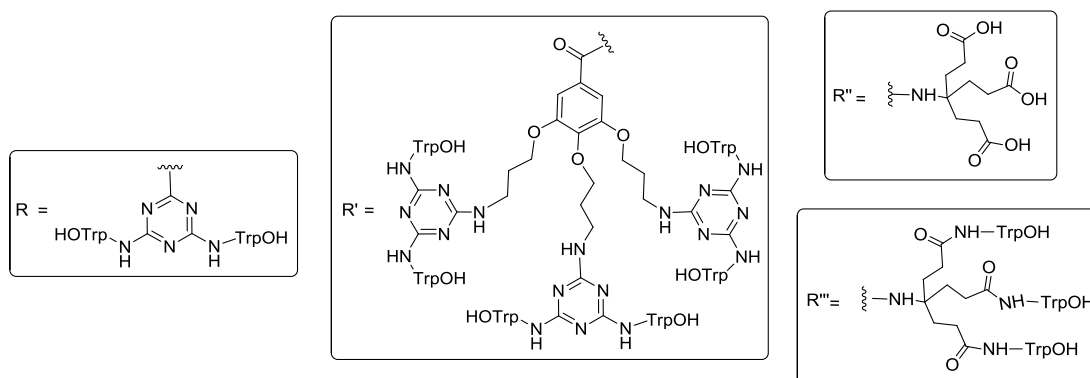
fuesen, indica claramente que el número de triptófanos en la periferia es importante para la actividad.

A la misma conclusión se llega si se comparan los compuestos **30e** y **30f**, con esqueletos similares y distinto número de triptófanos en la periferia. Así, los datos de actividad indican claramente que **30f** (15 Trp) es más activo que **30e** (12 Trp).

Con respecto al papel del esqueleto central en la actividad comentar que para los compuestos **26a**, **26b**, **26c** y **26d**, el esqueleto central parece no jugar un papel importante en la actividad antiviral tal y como lo demuestra el hecho de que todos ellos presentan una actividad muy similar.

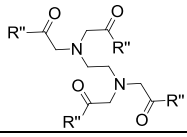
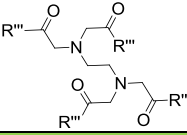
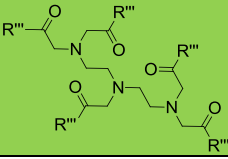
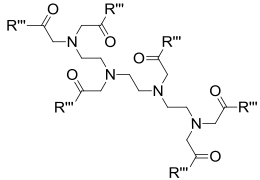
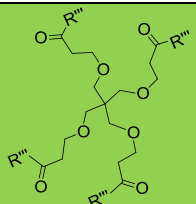
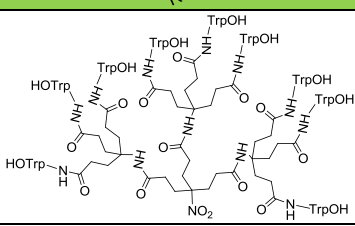
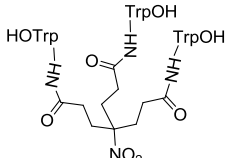
Sin embargo, en los compuestos **30e** y **34** la estructura del esqueleto central y por lo tanto, la distribución espacial de los triptófanos, sí parece importante para la actividad anti-VIH. Así, el compuesto **34**, con 12 triptófanos en la periferia y un esqueleto central de pentaeritritol, resultó 5 veces más activo que **30e**, con el mismo número de triptófanos (12) pero con un esqueleto central de EDTA.

Merece la pena destacar que los compuestos de la segunda serie de síntesis sencilla y eficaz (4 etapas sintéticas), resultaron igual o incluso más activos que los de la primera, cuya síntesis requirió un mayor número de etapas sintéticas (9 etapas sintéticas), lo que es de gran interés desde un punto de vista práctico.

Tabla 1. Actividad antiviral frente a VIH-1 y VIH-2 en células CEM/0


	EC ₅₀ (μM) HIV-1	EC ₅₀ (μM) HIV-2	CC ₅₀ (μM)	n° Trp	Triazina	Esqueleto central
1	14 ± 0.71	15 ± 7.1	58 ± 1.4	12	SI	
2	1.0 ± 0.15	19 ± 2.8	52 ± 1.4	18	SI	
13	36	50	148 ± 8.5	6	SI	
21	>100	>100	>100	3	NO	
24a	>250	>250	>250	0	NO	
24c	>250	>250	>250	0	NO	
26a	5	-	>100	9	NO	
26b	1.2	-	53	9	NO	
26c	2	-	>250	9	NO	
26d	2.5	-	59	9	NO	

Tabla 1. Continuación

	EC ₅₀ (μM) ^a HIV-1	EC ₅₀ (μM) ^a HIV-2	CC ₅₀ (μM) ^b	Trp n ^{os}	Triazina	Esqueleto central
28e	>250	>250	>250	0	NO	
30e	11.3 ± 2.8	≥100	>100	12	NO	
30f	3	10	>100	15	NO	
30g	-	-	-	18		
34	2.3 ± 0.30	6.6 ± 7.7	>100	12	NO	
40	9.9 ± 1.6	44 ± 2.8	>100	9	NO	
42	>100	>100	>100	3	NO	
AL-195	16 ± 0.71	22 ± 2.8	>250	6	SI	-

^aEC₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios

^bCC₅₀: concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular

Estudios de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR)

A continuación nos propusimos evaluar la capacidad de los compuestos sintetizados para interactuar con la glicoproteína gp120 presente en la cubierta viral del VIH. Para ello hemos utilizado una técnica basada en un biosensor con detección por Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR). Estos experimentos han sido realizados en la Universidad Católica de Lovaina bajo la supervisión del Dr. Jan Balzarini. Algunos de estos experimentos los realicé durante una estancia predoctoral de tres meses en ese centro.

Estudios de la interacción de los compuestos con las proteínas gp120, gp41 y HSA

En primer lugar ensayamos la afinidad de los compuestos por la glicoproteína viral gp120 mediante SPR. En los ensayos siempre se emplearon dos concentraciones de compuesto, a 10 μ M y 50 μ M. Es importante señalar que cada chip biosensor es independiente, ya que el grado de inmovilización de la gp120 es diferente, por lo que los resultados obtenidos a partir de diferentes chips no pueden ser comparados. En este caso, para llevar a cabo los ensayos se empleó un chip de alta densidad (5300RU para gp120, 6000RU para gp41 y 5520RU para HSA). Además, el compuesto empleado como referencia es la PRM-A que se une con gran afinidad a los carbohidratos presentes en gp120 y en menor medida a gp41.

En primer lugar se ensayaron los compuestos de la primera serie con anillos de triazina en su estructura. Tal y como se observa en la Figura 14, los compuestos **1** (12 Trp), **2** (18 Trp) y **13** (6 Trp) mostraron cierta afinidad por la glicoproteína viral gp120, siendo esta mayor para el compuesto **13**.

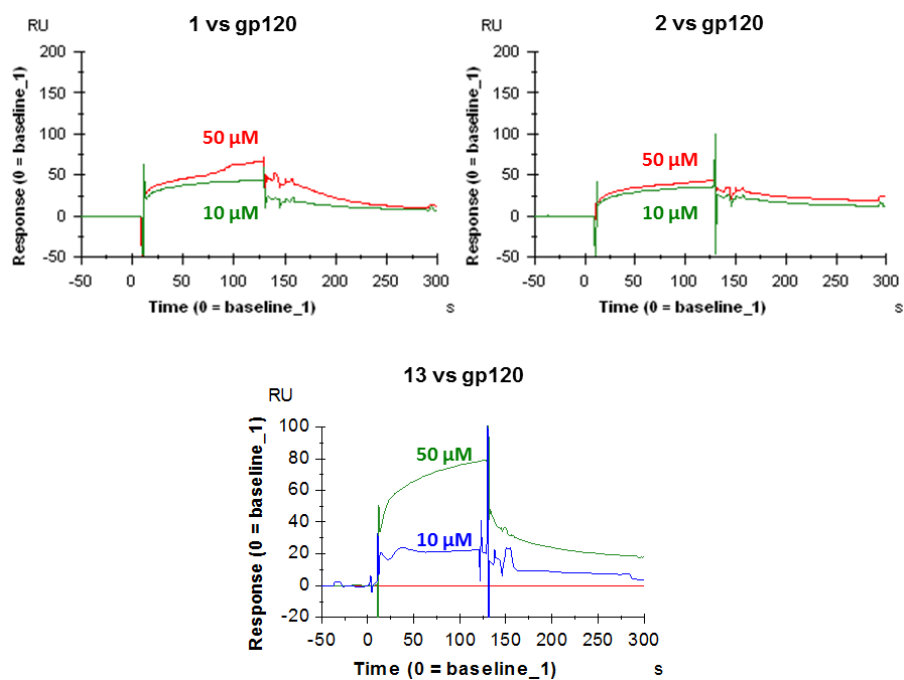


Figura 14. Sensorgramas de los compuestos 1, 2 y 13 con gp120

Los sensorgramas representados en la Figura 15 indican que los tres compuestos también interaccionan con gp41, siendo dicha interacción mayor que la observada para la glicoproteína viral gp120. En este caso la interacción del compuesto **13** con la glicoproteína gp41 también fue mayor que la observada con **1** y **2**.

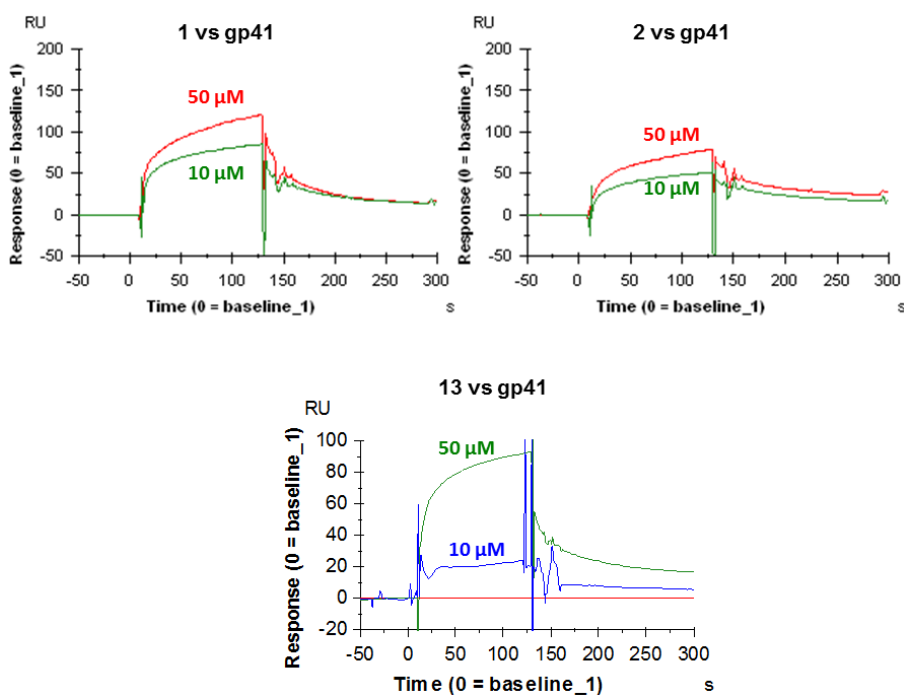


Figura 15. Sensorgramas de los compuestos 1, 2 y 13 con gp41

Asimismo, se determinó la interacción de **1**, **2** y **13** con la albúmina de suero humano (HSA), una proteína que no presenta carbohidratos en su superficie, que se utilizó como referencia. Los sensorgramas que se muestran en la Figura 16 indican que los tres compuestos también establecen algo de interacción con HSA aunque en menor medida que con las proteínas virales gp120 y gp41.

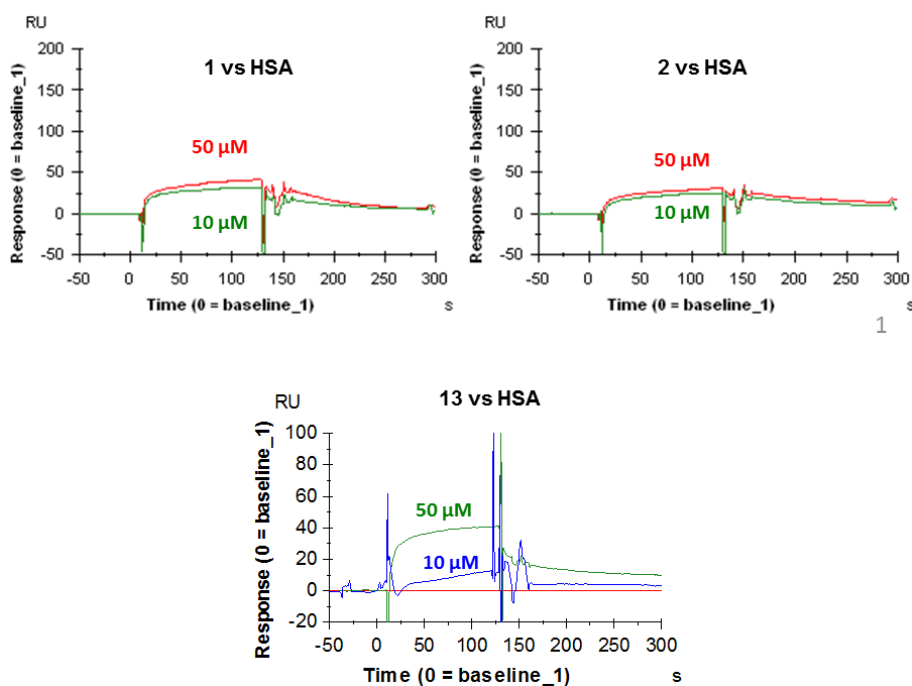


Figura 16. Sensorgrama de los compuestos 1, 2 y 13 con HSA

A continuación se llevaron a cabo los ensayos de SPR de los compuestos correspondientes a la segunda serie que no poseen anillos de triazina en su estructura.

En primer lugar, el dendrón **40** con 9 triptófanos en la periferia fue evaluado frente a las proteínas gp120, gp41 y HSA. En la Figura 17 se recogen los sensorgramas para dicho compuesto. Los datos indican que existe interacción tanto con gp120 como con gp41, siendo ésta mayor para gp41. Para HSA la señal fue casi inexistente o muy débil.

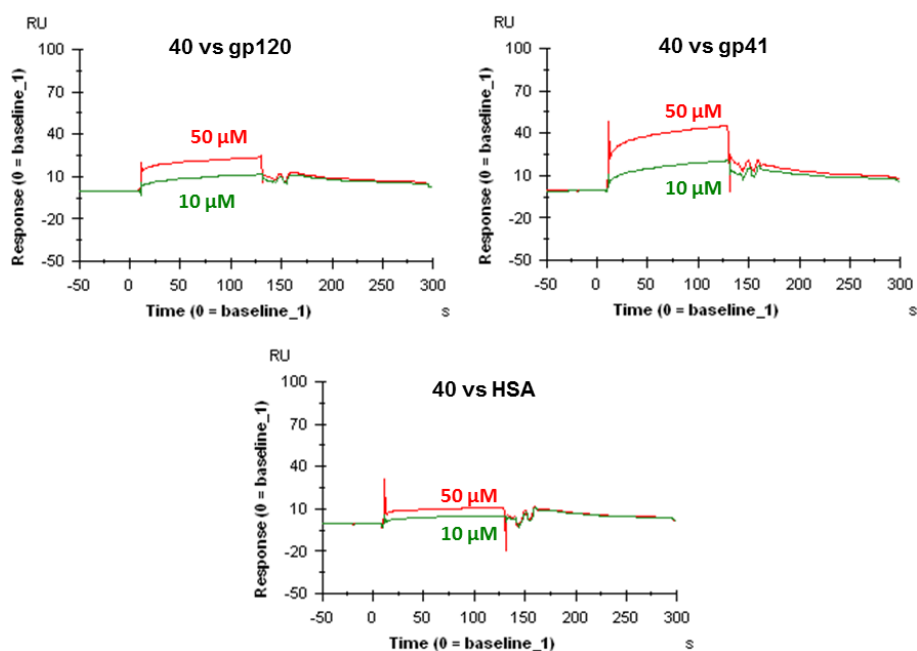


Figura 17. Sensorgrama del compuesto 40 con gp120, gp41 y HSA

Seguidamente se evaluaron los compuestos con 12 unidades de triptófano en la periferia, **30e** (esqueleto de EDTA) y **34** (esqueleto de pentaeritritol). Los sensorgramas representados en las Figuras 18-20 indican que los dos compuestos establecen interacción con las glicoproteínas gp120 y gp41, siendo mayor para gp 41. También se observa, aunque en menor medida, interacción con HSA.

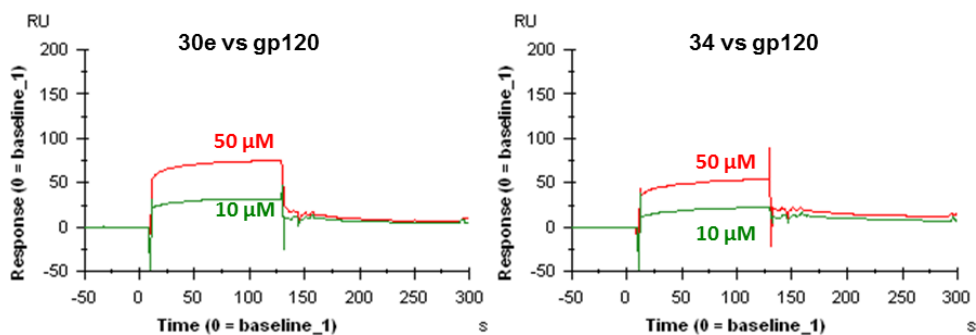


Figura 18. Sensorgramas de los compuestos 30e y 34 con gp120

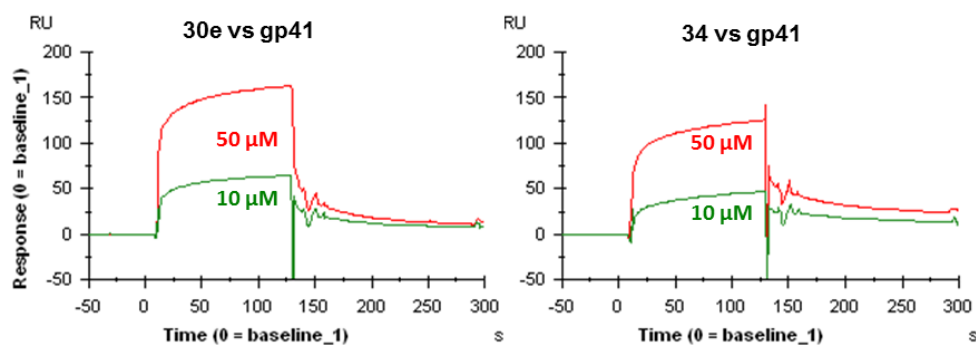


Figura 19. Sensorgramas de los compuestos 30e y 34 con gp41

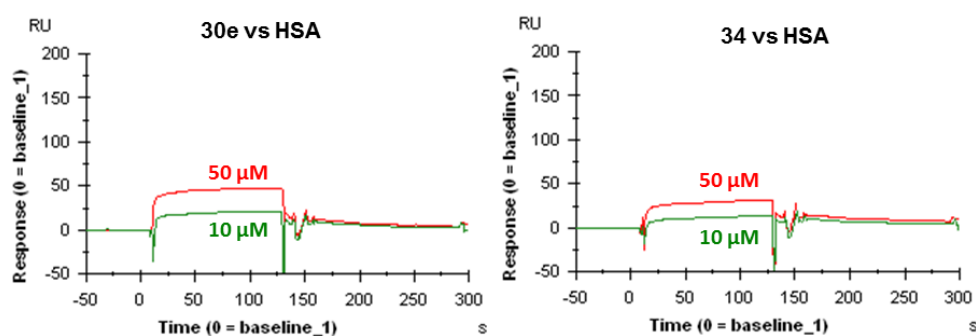


Figura 20. Sensorgramas de los compuestos 30e y 34 con HSA

Seguidamente, llevamos a cabo los ensayos de los compuestos con 9 triptófanos (**26a**, **26b**, **26c** y **26d**) y el compuesto **30f** con 15 triptófanos en la periferia (Figura 21). En este caso la concentración de compuesto empleada fue de 50 µM y la densidad de chip empleada fue distinta a la de los ensayos anteriores. A partir de este momento los experimentos se realizan con un chip de alta densidad (11241RU para gp120, 3836RU para gp41 y 5600RU para HSA).

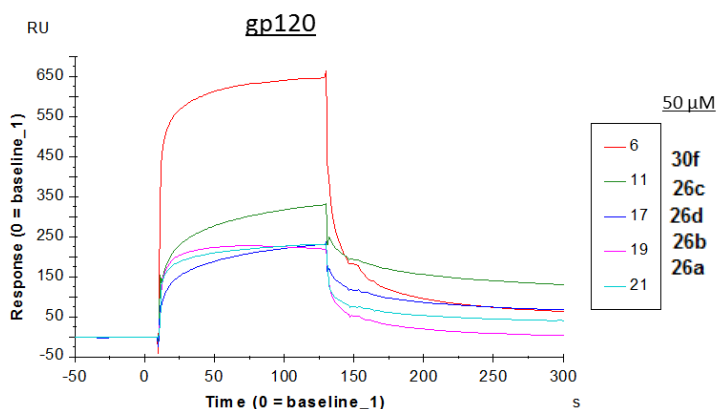


Figura 21. Sensorgrama de los compuestos 26a, 26b, 26c, 26d y 30f con gp120

Tal y como se observa en la Figura 21 todos los compuestos interaccionan con la glicoproteína gp120, siendo el compuesto **30f** el que presentó la mayor respuesta ($RU_{\text{máx}} = 650$).

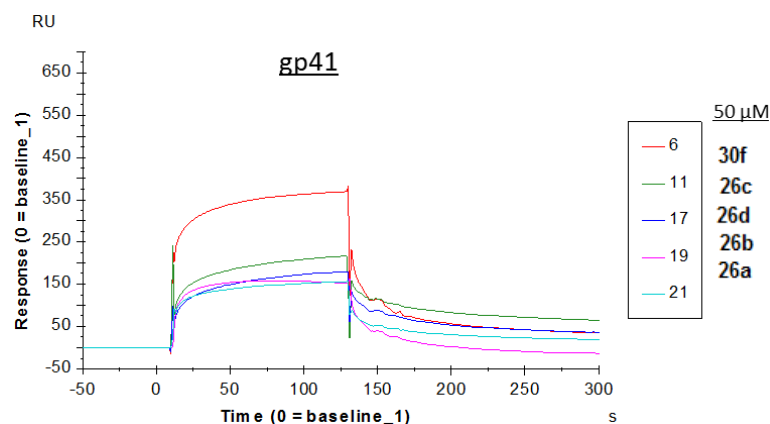


Figura 22. Sensorgrama de los compuestos 26a, 26b, 26c, 26d y 30f con gp41

Asimismo, en el sensorgrama de la Figura 22 se observa que dichos compuestos interaccionan también con la glicoproteína gp41 pero esta unión es menor que la observada para la glicoproteína gp120.

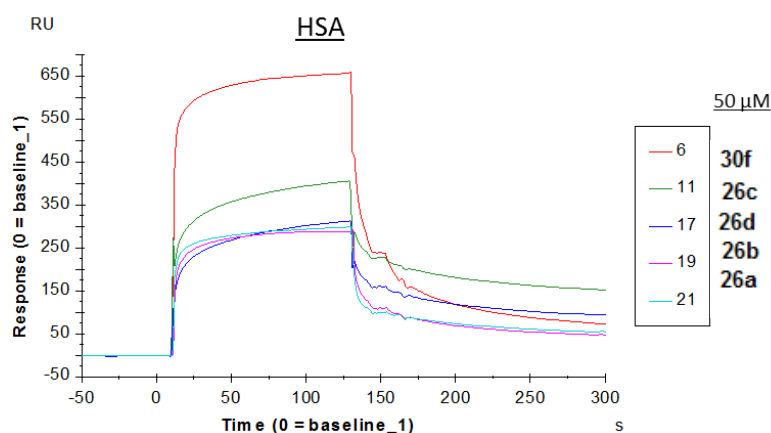


Figura 23. Sensorgrama de los compuestos 26a, 26b, 26c, 26d y 30f con HSA

Por otra parte, en el sensorgrama de la Figura 23 se puede observar que todos los compuestos establecen interacción con HSA, siendo la respuesta obtenida muy similar a la obtenida para gp120.

Por último, llevamos a cabo el estudio del compuesto **30g** con 18 unidades de triptófano en la periferia. Los sensorgramas representados en la Figura 24 indican que el compuesto establece interacción con las glicoproteínas gp120 y gp41 siendo mayor para

gp120. También se observa interacción con HSA siendo esta interacción mayor que la que establece con gp120.

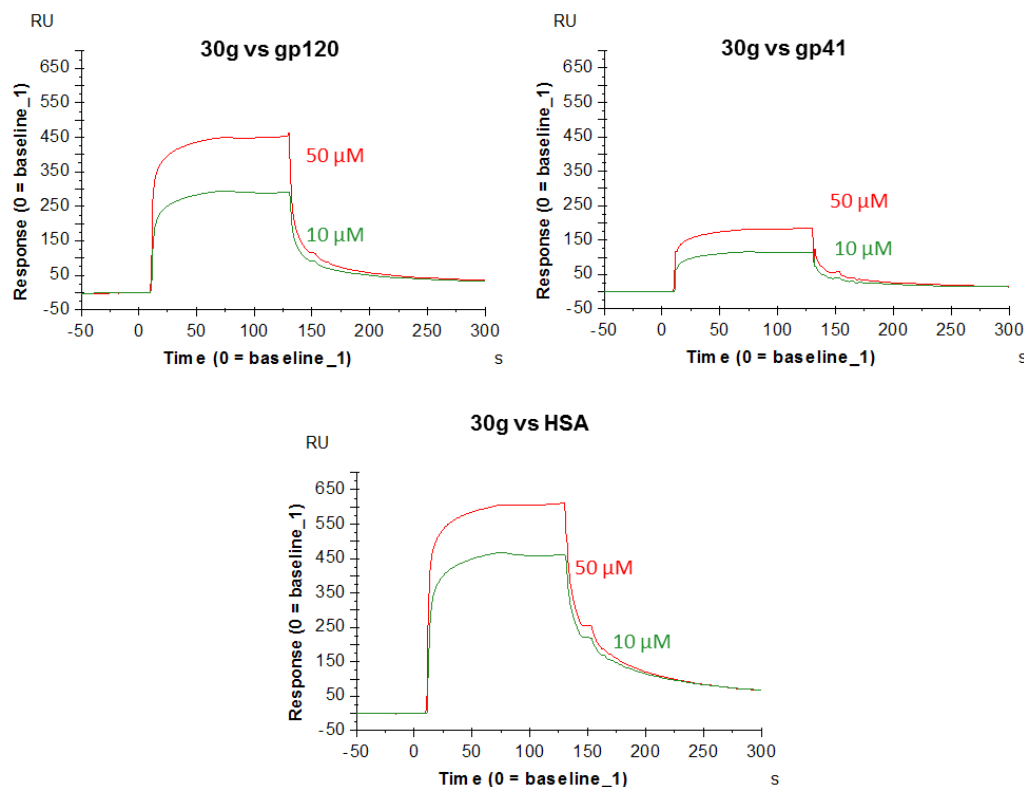


Figura 24. Sensorgramas del compuesto 30g con gp120, gp41 y HSA

De todos los compuestos ensayados, el **30f**, con 15 triptófanos en la periferia y esqueleto central no cíclico (Esquema 12, página 118), era el que presentaba mayor afinidad por la glicoproteína gp120, por lo que se decidió estudiar con más detalle la naturaleza de esta interacción mediante el experimento que se describe a continuación.

Tal y como se ha comentado en la introducción, la glicoproteína gp120 es rica en residuos de manosa y N-acetilglucosamina, y las lectinas y miméticos de lectinas como PRM-A o su análogo soluble PRM-S, son capaces de unirse a dichos glicósidos. Tal y como se ha comentado en el capítulo 1, en experimentos de competición de SPR sobre gp120 inmovilizada, la presencia de trímeros de manosa junto a pradimicina-S hace que la interacción de PRM-S con gp120 disminuya.¹² Por ello, con el fin de profundizar en el modo de interacción del compuesto **30f** con gp120, se realizaron experimentos de competición similares en presencia del trisacárido (man α (1-3)man α (1-6)man).

En el sensorgrama de la Figura 25 se puede observar que la presencia del trisacárido no influye en la capacidad de unión de **30f** a gp120. Este mismo efecto se observa en el caso de gp41. Esto podría sugerir que la interacción que **30f** establece con gp120 no se produce a nivel de los sacáridos de la gp120.

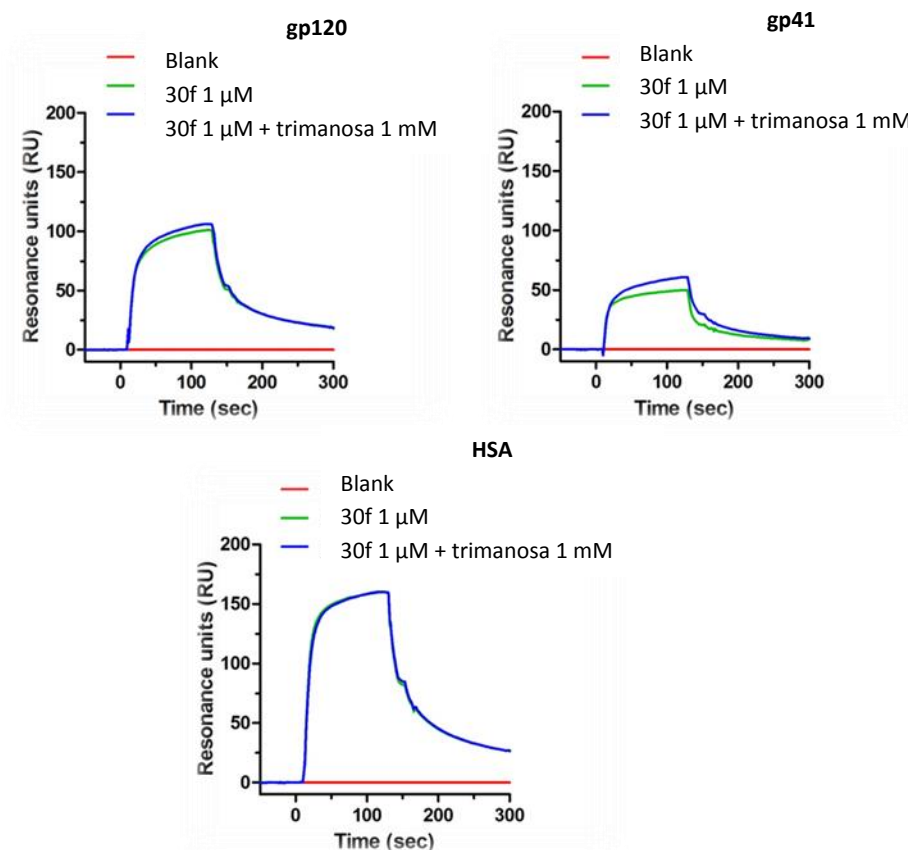


Figura 25. Sensorgrama de competición de 30f con el trisacárido

Por lo general, todos los compuestos ensayados interaccionan con albúmina de suero humano (HSA) e incluso para alguno de ellos, como es el caso de **30f**, la respuesta obtenida para la unión con gp120 y HSA es prácticamente la misma. El carácter polianiónico de nuestros compuestos podría favorecer la interacción con HSA, ya que como se recoge en la literatura, son muy numerosos los compuestos aniónicos, como la suramina, que pueden interaccionar con esta proteína del plasma.^{13,14} Por extensión, se podría postular que la unión que establecen los compuestos con gp120 y gp41 podría deberse, al menos en parte, a su carácter polianiónico y la interacción que establecen con dichas glicoproteínas sería a través de su parte proteica.

Es importante resaltar que el reconocimiento de gp120 y gp41 por las células del huésped es uno de los eventos iniciales en el ciclo replicativo del VIH, de modo que los compuestos capaces de interferir esa unión tienen interés como potenciales agentes microbicidas. En este sentido, nuestros compuestos se comportarían como algunos dendrímeros con grupos aniónicos como sulfonato o carboxilato en su superficie, diseñados específicamente para interactuar con la superficie del VIH que están siendo desarrollados como microbicidas.¹⁵

Estudios de cinética y afinidad

Los estudios de afinidad permiten calcular la constante de disociación en el equilibrio (constante de afinidad), K_D , la cual da idea de la fortaleza del complejo formado. A su vez, la constante de asociación en el equilibrio, K_A , indica la cantidad de complejo formado en el equilibrio, donde la velocidad de asociación iguala a la velocidad de disociación. Estos estudios son independientes del tiempo, una vez alcanzado el equilibrio.¹⁶ De un modo general, el cálculo de la constante de disociación para la interacción de una molécula de analito (A) con otra de ligando (L) para dar un complejo (A-L) se realiza a partir de la siguiente ecuación:

$$\begin{array}{c}
 A + L \rightleftharpoons A-L \\
 K_A = \frac{[A-L]_{\text{formado}}}{[A]_{\text{libre}}[L]_{\text{libre}}} \quad \left\{ \begin{array}{l} [L]_{\text{libre}} = [L]_{\text{total}} - [A-L]_{\text{formado}} \\ [A]_{\text{libre}} \sim \text{Concentración inicial de analito: } C \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} [L]_{\text{total}} = R_{\text{max}} \\ [A-L]_{\text{formado}} = R_{\text{eq}} \end{array} \right. \\
 \Downarrow \\
 K_A = \frac{[A-L]_{\text{formado}}}{[A]_{\text{libre}}([L]_{\text{total}} - [A-L]_{\text{formado}})} = \frac{R_{\text{eq}}}{C(R_{\text{max}} - R_{\text{eq}})} \quad (1)
 \end{array}$$

Así, cuando $R_{\text{eq}} = \frac{1}{2} R_{\text{max}}$, tras sustituir en la Ecuación 1 se obtiene que $C = 1 / K_A = K_D$

Con el objetivo de estudiar la cinética y afinidad de la interacción de **30f** con gp120, se realizaron una serie de experimentos de interacción con gp120 a diferentes concentraciones de **30f** (0, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 20 y 40 μM), por duplicado (Figura 26). También se llevaron a cabo los estudios de cinética y afinidad de **30f** con gp41 y HSA (Figuras 27 y 28).

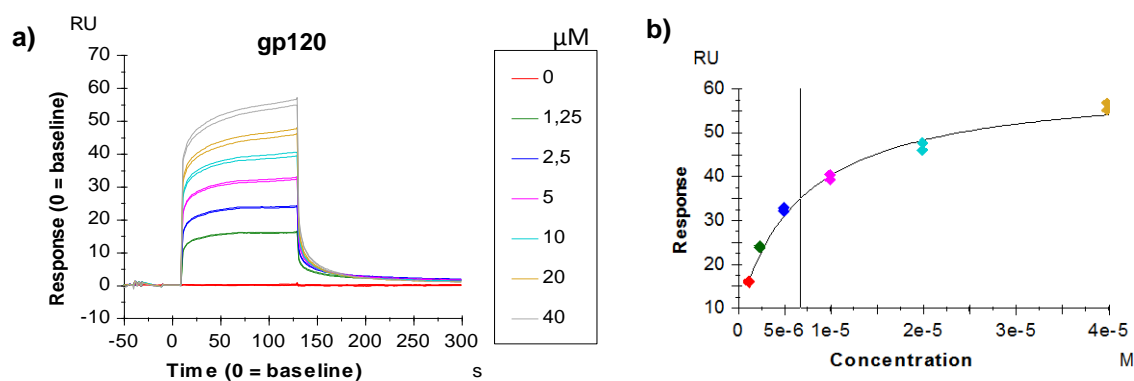


Figura 26. a) Sensorgrama obtenido frente a diferentes concentraciones de 30f
b) Cálculo de K_D mediante representación de Req frente a la concentración de 30f

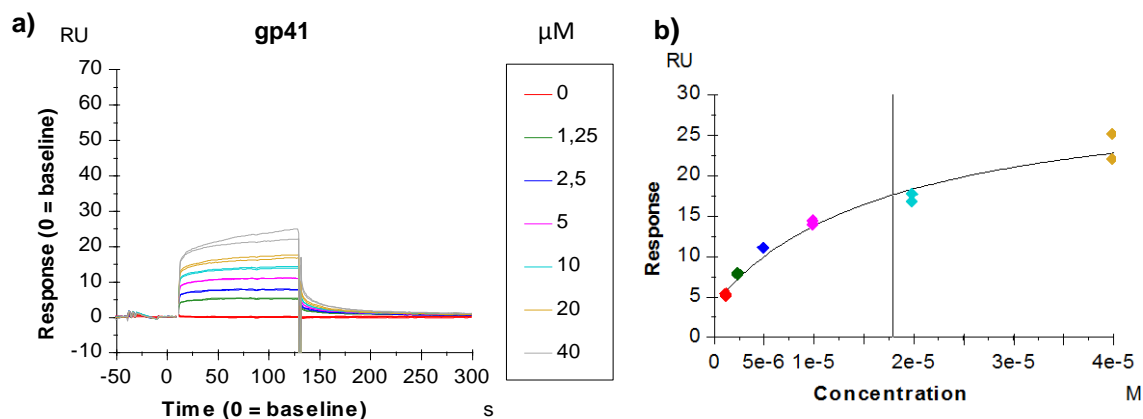


Figura 27. a) Sensorgrama obtenido frente a diferentes concentraciones de 30f
b) Cálculo de K_D mediante representación de Req frente a la concentración de 30f

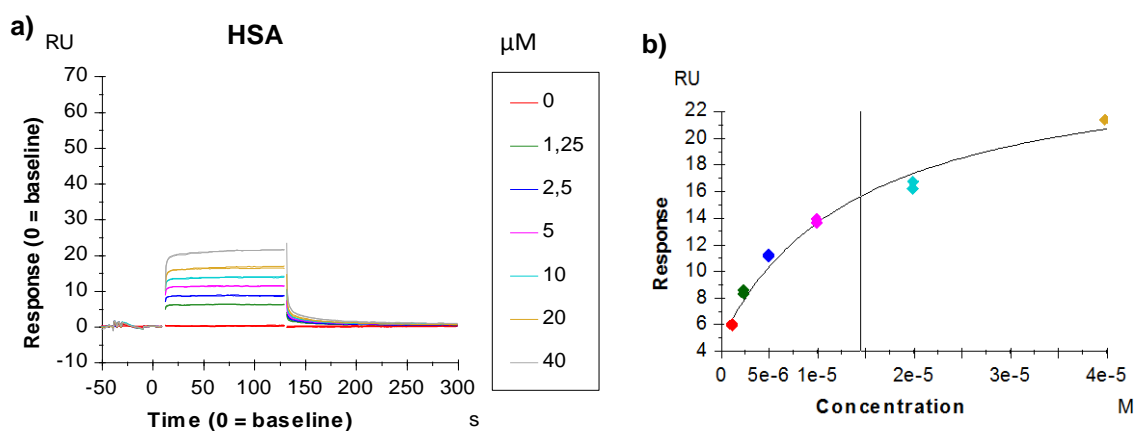


Figura 28. a) Sensorgrama obtenido frente a diferentes concentraciones de 30f
b) Cálculo de K_D mediante representación de Req frente a la concentración de 30f

De esta forma, la constante de afinidad, K_D del complejo gp120-**30f**, K_D del complejo gp41-**30f** y K_D del complejo HSA-**30f** fueron determinadas mediante representación de la respuesta obtenida en el equilibrio (R_{eq}) para cada concentración, obteniéndose las gráficas recogidas en las Figuras 26b, 27b, 28b para cada complejo respectivamente.

En la tabla 2, se indican los valores de K_D obtenida para cada uno de los complejos y la del prototipo **AL-195**.

Tabla 2. Valores de K_D obtenidos para los complejos 30f-gp120, 30f-gp41 y 30f-HSA

Complejo	K_D (μ M)
30f-gp120	6.7
30f-gp41	17.9
30f-HSA	14.4
AL-195-gp120	14

La constante de afinidad (K_D) obtenida para el complejo **30f-gp120** es de 6.7 μ M (unas 2 veces superior a la del prototipo **AL-195**) lo que indica que la unión que establece **30f** con gp120 es más fuerte que la que establece el prototipo. Por otro lado, los valores de K_D obtenidos para el complejo **30f-gp41** y **30f-HSA**, una proteína sin carbohidratos en la superficie, fueron 19.9 μ M y 14.4 μ M respectivamente, lo que indica la mayor fortaleza del complejo formado entre **30f** y gp120.

Estudios de tiempo de adición de 26b y 30f

Por último, nos propusimos evaluar la etapa del ciclo replicativo en la que ejercen su actividad los compuestos. Estos experimentos han sido realizados en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina bajo la supervisión del Dr. Jan Balzarini empleando un protocolo que había sido optimizado previamente.^{17,18}

Con el fin de conocer la etapa concreta sobre la que actúan nuestros compuestos, se llevaron a cabo experimentos de tiempo de adición con los compuestos **26d** y **30f**. En este ensayo se lleva a cabo la detección del antígeno p24 (p24 es la principal proteína estructural del virión) mediante un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, en inglés) (Perkin Elmer, Bruselas, Bélgica).

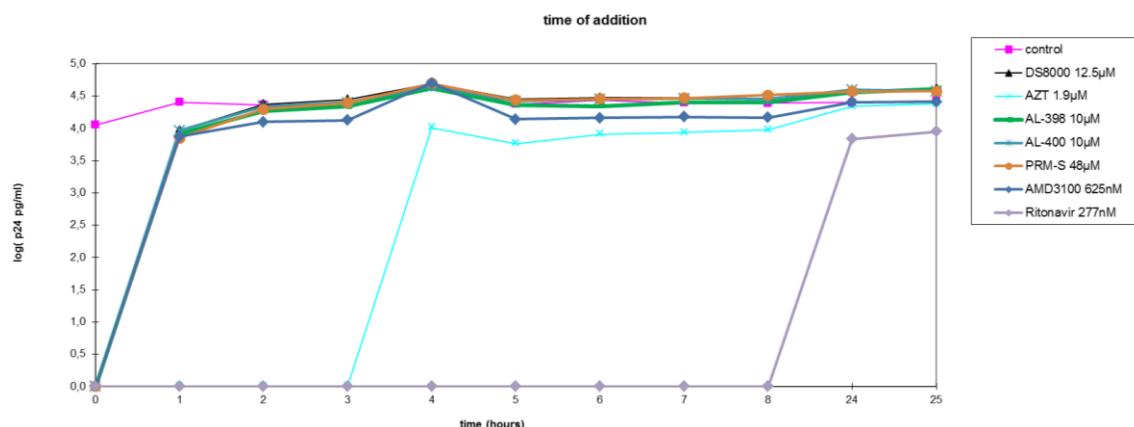


Figura 29. Ensayo tiempo de adición de 26d y 30f

En la Figura 29 se muestran los resultados de dicho ensayo. Como se observa en dicha figura, además de un control, empleamos compuestos de referencia para los que se conoce la etapa del ciclo replicativo en la que actúan y sobre la que ejercen su acción. Como inhibidores de la etapa de entrada se emplearon PRM-S, AMD3100 y DS8000, como inhibidor de la transcriptasa inversa AZT y como inhibidor de proteasa Ritonavir.

Si nos fijamos en los compuestos **26d** y **30f**, sus curvas son coincidentes con las de los compuestos que actúan como inhibidores de la entrada, por lo tanto, este ensayo confirma que los compuestos descritos en este capítulo actúan en etapas tempranas del ciclo viral, más en concreto, inhiben la entrada del virus en la célula. Dicha inhibición la consiguen mediante la interacción preferente con las glicoproteínas (gp120 y gp41) de la envoltura del VIH evitando la interacción entre el VIH y los receptores presentes en las células huésped, y con ello, las posteriores etapas del ciclo replicativo del VIH.

CONCLUSIONES

A partir del prototipo **AL-195** ($EC_{50} = 16 \mu\text{M}$; $CC_{50} > 250 \mu\text{M}$), con un anillo central de trietilbenceno sustituido con anillos de triazina y de 6 residuos de triptófano, descrito con anterioridad por el grupo de trabajo, se han preparado dendrímeros de triptófano con 9, 12, 15 y 18 triptófanos en la periferia. Para su síntesis se emplearon estrategias convergentes y divergentes propias de la síntesis de dendrímeros.

Los datos de actividad anti-VIH encontrados permiten concluir que el anillo de triazina no es imprescindible para la actividad mientras que el triptófano sí lo es. Este dato es de gran interés práctico ya que la síntesis de los dendrímeros sin triazina es mucho más eficaz (menos pasos de reacción y mejor rendimiento) que la de los dendrímeros con triazina. El compuesto **26c** con 9 triptófanos en la periferia y un esqueleto central de benceno es el que presenta un mejor perfil de actividad/toxicidad ($CE_{50} = 2 \mu\text{M}$, $CC_{50} > 250 \mu\text{M}$). Dicho compuesto resultó ser 8 veces más activo que el prototipo **AL-195**.

La capacidad de los compuestos sintetizados para interactuar con la gp120 presente en la envoltura del virus fue evaluada mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR). Todos los compuestos mostraron una unión significativa a las glicoproteínas gp120 y gp41 situadas en la superficie viral, siendo el compuesto **30f**, con 15 triptófanos en la periferia, el que establece la interacción más notable.

La constante de afinidad (K_D) obtenida para el complejo **30f-gp120** es de $6.7 \mu\text{M}$ (unas 2 veces superior a la del prototipo **AL-195**) mientras que los valores de K_D obtenidos para el complejo **30f-gp41** y **30f-HSA**, una proteína sin carbohidratos en la superficie, fueron $19.9 \mu\text{M}$ y $14.4 \mu\text{M}$ respectivamente, lo que indica la mayor fortaleza del complejo formado entre **30f** y gp120.

Por otra parte, con el fin de conocer la etapa en la que actúan los compuestos sobre el ciclo replicativo viral, se llevaron a cabo estudios de tiempo de adición. Los resultados obtenidos indican que nuestros compuestos actúan en etapas tempranas de dicho ciclo, más en concreto, inhiben la entrada del virus en la célula.

Por tanto podemos concluir que nos hallamos ante una nueva familia de inhibidores de la entrada del VIH-1 en la célula, con capacidad de unirse a las glicoproteínas gp120 y gp41 de

la superficie viral. Los resultados obtenidos sugieren que los compuestos descritos en este capítulo podrían interactuar con la glicoproteína gp120 mediante interacciones iónicas (carga-carga) similares a las que se establecen entre los polianiones y las regiones básicas de gp120, si bien deben establecerse también otro tipo de interacciones adicionales en las que podría participar el anillo de indol presente en el triptófano (imprescindible para la actividad). Hay que tener en cuenta que para ejercer su acción antiviral, nuestros compuestos no necesitarían entrar en las células y que además, interactuarían “per se” con las glicoproteínas de la superficie viral, por lo que no necesitarían una metabolización o activación celular. En este sentido, podrían ser de interés para su desarrollo como microbicidas.

PARTE EXPERIMENTAL

Método general A para la reacción de acoplamiento de los esqueletos centrales y el dendrón aminotriéster 22

A una disolución del correspondiente esqueleto central (con grupos ácido carboxílico), el dendrón aminotriéster comercial **22** y HATU en DMF (20 mL), se le añade DIPEA. La mezcla se deja reaccionar durante dos días a temperatura ambiente y el crudo de reacción se concentra a sequedad. El residuo se lava sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (3 x 30 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 30 mL) y NaCl (1 x 30 mL). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a sequedad. El residuo correspondiente se disuelve en ácido fórmico (30 mL) y se calienta durante 2 días a 40°C. A continuación, el crudo de reacción se disuelve en metanol y se añade acetato de etilo, hasta precipitación.

Método general B para la reacción de acoplamiento con triptófano

A una disolución de triptófano (protegido como éster bencílico o metílico; 1.5 eq/ grupo carboxilo del esqueleto central), el esqueleto central con grupos ácido carboxílico y HATU en DMF (20 mL) se le añade DIPEA. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante un mínimo de 3 días, en el caso de los compuestos con 9 y 12 triptófanos en la periferia, y 4 días en el caso de los compuestos con 15 y 18 triptófanos en la periferia. Se evapora el disolvente a vacío y el crudo de reacción se lava sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (3 x 30 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 30 mL) y NaCl (1 x 30 mL). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a sequedad. El residuo resultante se purifica mediante cromatografía de media presión (HPFC) en un sistema Biotage empleando fase normal (DCM/metanol como eluyente) o fase reversa (acetonitrilo/agua como eluyente).

Procedimiento general C para la desprotección de los ésteres metílicos

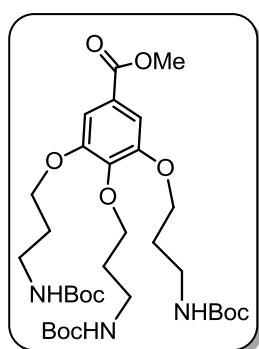
Una disolución que contiene el correspondiente derivado metilado en THF (10 ml) se trata con una disolución de $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2 equivalentes por grupo éster metílico) en agua (10 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante un mínimo de 3 días en el caso de los compuestos con 9 y 12 triptófanos en la periferia; y 5 días en el caso de los compuestos con 15

y 18 triptófanos en la periferia. Transcurrido ese tiempo, se adiciona ácido trifluoroacético hasta pH 2 y se evapora el disolvente. El crudo de reacción se disuelve en isobutanol y se lava con agua (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a sequedad. En cada caso se indican las condiciones empleadas para purificar el residuo resultante.

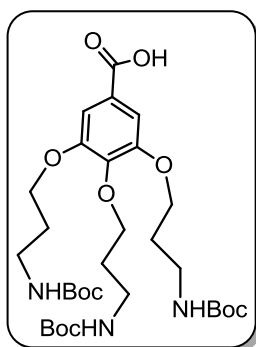
Método general D para la desprotección de los ésteres bencilicos

A una disolución del correspondiente derivado bencilado en THF/metanol (1:1), se le añade Pd/C (10%). La disolución se hidrogena a 30 °C y 2.9 atm (42 psi) en un reactor Parr durante la noche. A continuación se filtra el catalizador sobre filtro Whatman[®] 42, se lava con metanol y el filtrado se evapora a sequedad para dar lugar al correspondiente derivado desprotegido. En cada caso se indican las condiciones empleadas para purificar el residuo resultante.

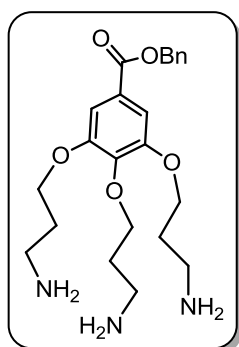
Dendrón 3,4,5-Tris[3-(*N*-*tert*-butoxicarbonil)amino-1-propanoxi]carboxilato de metilo (5)⁵



A una disolución que contiene metil galato **3**⁵ (250 mg, 1.36 mmol) en DMF (20 mL) se le añade *N*-Boc-3-bromopropilamina **4** (1.17 g, 4.9 mmol) y K_2CO_3 (1.35 g, 9.79 mmol). La mezcla se deja reaccionar toda la noche a 80 °C. El crudo de reacción se evapora a sequedad, se disuelve en acetato de etilo (20 mL) y se lava con NaCl (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetato de etilo/hexano, 3:1→1:1) obteniéndose 840 mg (94%) de **5** como un sirupe transparente. Los datos analíticos y espectroscópicos coinciden con los descritos en la literatura.⁵

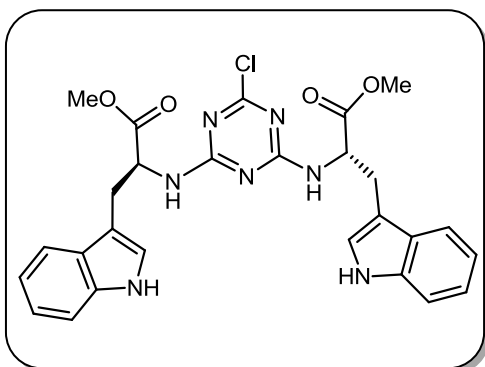
Dendrón ácido 3,4,5-Tris[3-(*N*-*tert*-butoxicarbonil)amino-1-propanoxi]benzoico**(6)⁵**

A una disolución del compuesto anterior **5⁵** (840 mg, 1.8 mmol) en DCM (20 mL) se le añade una disolución de KOH 1N en metanol (15 mL). La mezcla se deja reaccionar toda la noche a reflujo. Transcurrido ese tiempo, el crudo de reacción se evapora a sequedad, se disuelve en DCM (20 mL) y se lava con disolución de ácido cítrico al 10% (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 718 mg (87%) de **6** como un sirupe amarillo. Los datos analíticos y espectroscópicos coinciden con los descritos en la literatura.⁵

Dendrón 3,4,5-Tris(*N*-3-amino-1-propanoxi)carboxilato de bencilo (8)

A una disolución que contiene el compuesto **6⁵** (162 mg, 0.2 mmol) en acetonitrilo (2 mL) se le añade DBU (1,8 diazabicyclo [5,4,0] undeca-7-eno) (54 µL, 0.363 mmol) y bromuro de bencilo (43 µL, 0.363 mmol). La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas y el crudo de reacción se evapora a sequedad. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (DCM/metanol, 20:1) obteniéndose 196 mg (96%) de **7** como un sólido blanco. A una disolución de **7** (740 mg, 1.01 mmol) en DCM (43 mL), se le añade ácido trifluoroacético (1.07 mL) y trietilsilano (108 µL) a 0°C. La mezcla de reacción se deja reaccionar durante 5 minutos a 0 °C. A continuación, se deja alcanzar la temperatura ambiente y la mezcla de reacción se evapora a sequedad (en el procesado es muy importante co-evaporar varias veces con DCM para quitar todos los posibles restos de ácido trifluoroacético), obteniéndose el compuesto **8** en forma de sirupe que sin purificar fue empleado inmediatamente en el paso siguiente. EM (ESI, positivo): m/z 432.50 (M+H)⁺. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ: 2.10 (q, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₂), 2.19 (q, 4H, J = 7.0 Hz, CH₂CH₂), 3.17 (t, 4H, J = 7.5 Hz, CH₂NH), 3.24 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH₂NH), 4.19 (m, 6H, OCH₂), 5.35 (s, 2H, CH₂Ar), 7.31-7.46 (m, 7H, Ar).

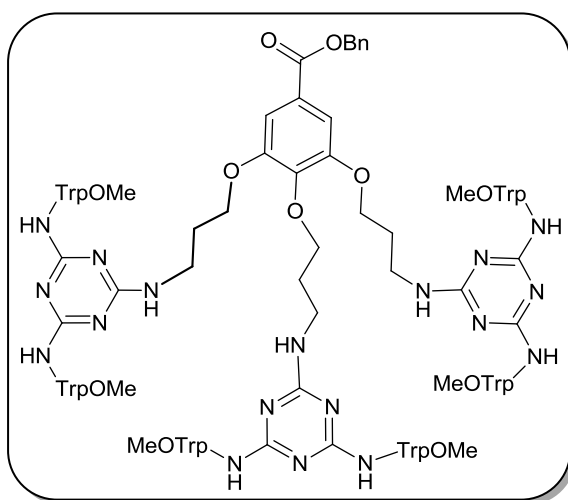
6-cloro-2,4-bis-(OMe)triptofanil-1,3,5-Triazina (10)^{1,2}



A una disolución que contiene cloruro cianúrico **9** (2.18 g, 11.8 mmol) en THF (30 ml), se le añade H-Trp-OMe.HCl (5.99 g, 23.6 mmol) y DIPEA (16.4 ml, 94.2 mmol). La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 12 horas y el crudo de reacción se evapora a

sequedad. El residuo se disuelve en acetato de etilo (20 mL) y se lava con NH₄Cl (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (DCM/metanol, 20:1) obteniéndose 6.43 g (99%) de **10** como un sólido blanco. Los datos analíticos y espectroscópicos coinciden con los descritos en la literatura.^{1,2}

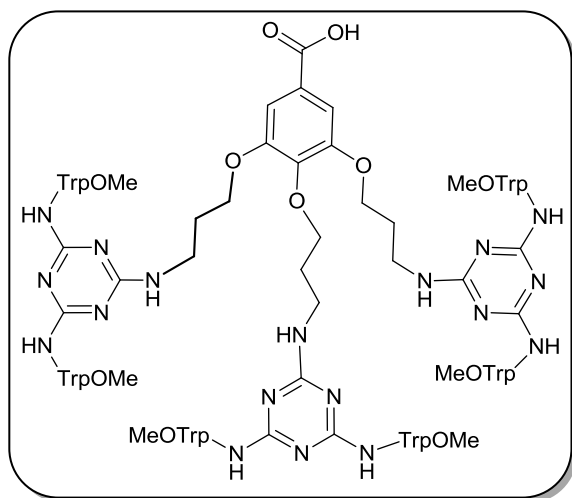
Dendrón 3,4,5-Tris-3-*N*-[1,3,5-triazinil-2,4-bis-(OMe)triptofanil]amino-1-propanoxi]carboxilato de bencilo (11)



A una disolución que contiene el compuesto **8** (152 mg, 0.352 mmol) en dioxano (15 mL), se le añade el derivado de triazina **10**^{1,2} (600 mg, 1.10 mmol) y DIPEA (1.13 mL, 6.5 mmol). La mezcla se deja reaccionar a 100 °C en el microondas durante 4 horas y el crudo de reacción se evapora a sequedad. A continuación, se lava con disolución de NH₄Cl (3 x 30 mL).

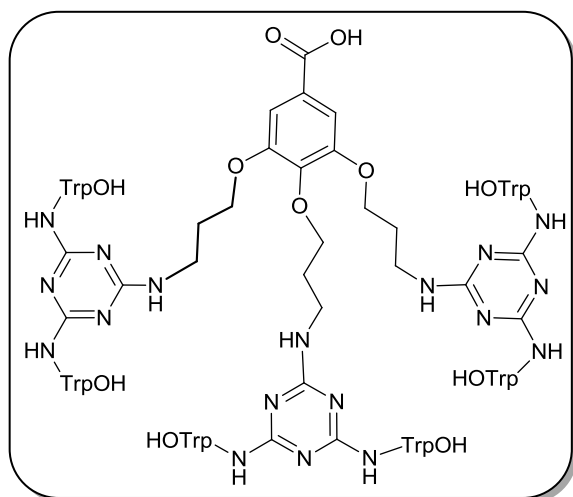
La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), filtra y evapora a sequedad. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (DCM:metanol, 100:0→30:1) obteniéndose 261 mg (38%) de **11** como un sólido blanco; p.f. 240-242 °C. EM (ESI, positivo): m/z 984.71 (M+2H)²⁺, 656.73 (M+3H)³⁺. ¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂O) δ: 1.80 (m, 6H, CH₂CH₂), 2.95–3.25 (m, 18H, β-CH₂Trp, CH₂NH), 3.62 (m, 18H, OCH₃), 4.10 (m, 6H, OCH₂), 4.85 (m, 6H, α-CHTrp), 6.97-7.62 (m, 36H, NH, H-2ⁱTrp, Ar), 10.23 (s_{ancho}, 6H, NH-1ⁱTrp).

Dendrón ácido 3,4,5-Tris-3-*N*-[1,3,5-triazinil-2,4-bis-(OMe)triptofanil]amino-1-propanoxi]benzoico (12)



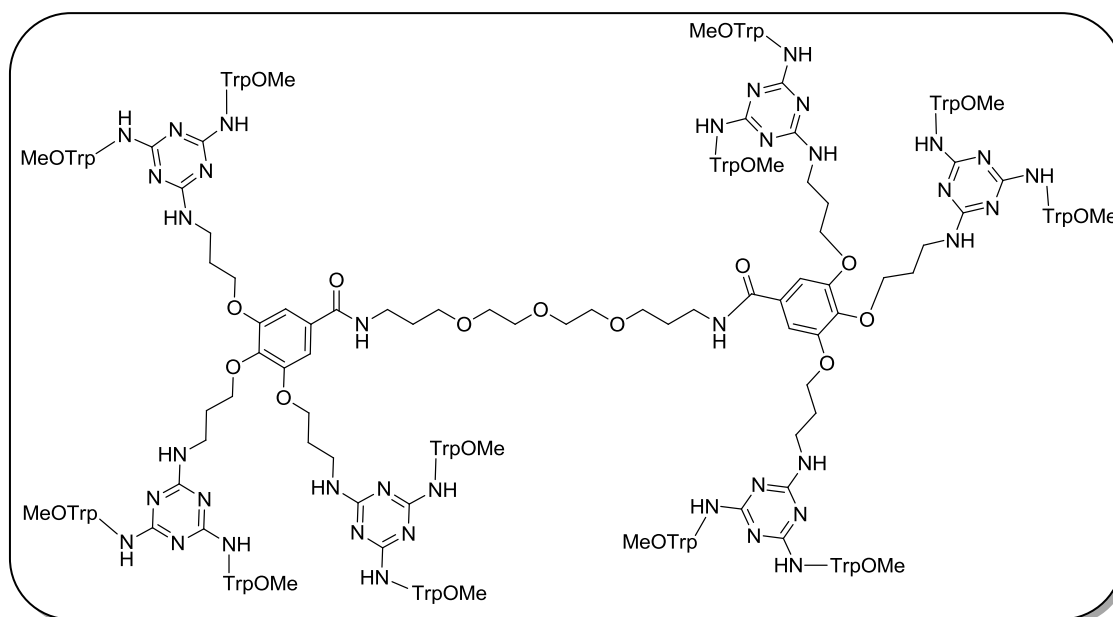
Una disolución de **11** (500 mg, 0.035 mmol) en AcOEt/metanol (3:1, 10 mL) se desprotege siguiendo el método general de desprotección de ésteres bencílicos D, obteniéndose 407 mg de **12** (85%) como un aceite marrón. MS (ESI, positivo): m/z 939.66 ($M+2H$)²⁺, 626.64 ($M+3H$)³⁺. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.75 (m, 6H, CH₂CH₂), 2.90–3.50 (m, 18H, β -CH₂Trp, CH₂NH), 3.97 (m, 6H, OCH₂), 4.55 (m, 6H, α -CHTrp), 6.90–7.50 (m, 39H, NH, H-2ⁱTrp, Ar), 10.75 (s_{ancho}, 6H, NH-1ⁱTrp).

Dendrón ácido 3,4,5-Tris-3-*N*-[1,3,5-triazinil-2,4-bis-(OH)triptofanil]amino-1-propanoxi]benzoico (13)



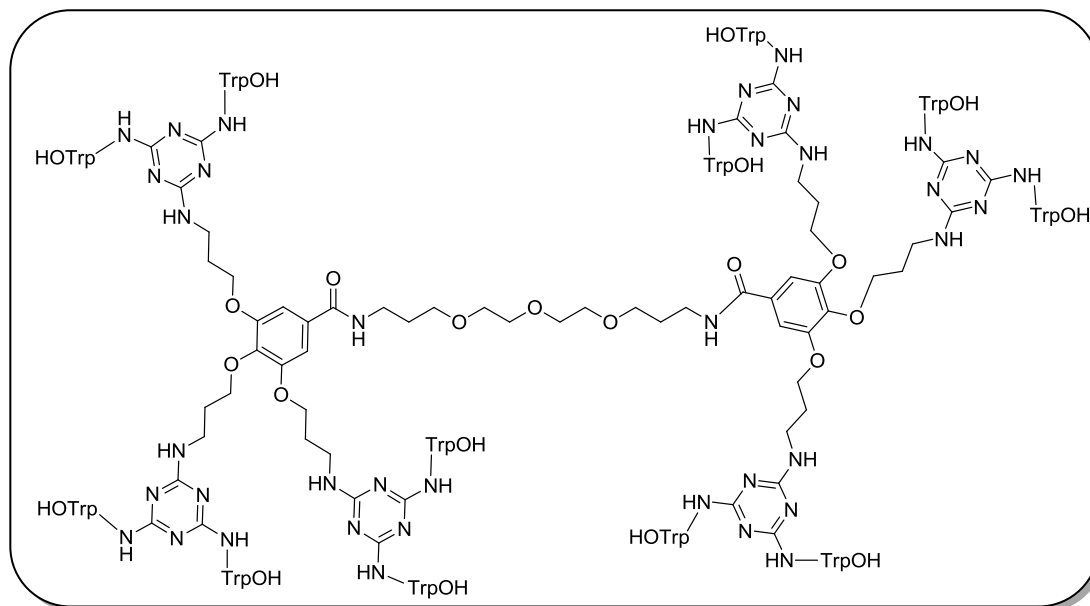
A una disolución del compuesto **11** (402 mg, 0.020 mmol) en DCM (10 mL) se le añade una disolución de KOH 1N en metanol (2 mL, 2 mmol). La mezcla se deja reaccionar toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se adiciona ácido fórmico hasta pH 2 y se evapora el disolvente. El residuo se purifica empleando una resina de intercambio iónico Dowex 1x2 en forma Cl⁻, obteniéndose 0.02 g de **13** (57%) como un sólido blanco. EM (ESI, positivo): m/z 897.05 ($M+2H$)²⁺, 598.30 ($M+3H$)³⁺. ¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂O) δ : 1.80 (m, 6H, CH₂CH₂), 2.90–3.30 (m, 18H, β -CH₂Trp, CH₂NH), 3.62 (s, 18H, OCH₃), 4.10 (m, 6H, OCH₂), 4.80 (m, 6H, α -CHTrp), 6.98–7.6 (m, 39H, NH, H-2ⁱTrp, Ar), 10.01 (s_{ancho}, 6H, NH-1ⁱTrp).

Dendrímero dodeca(OMe)triptófano derivado de O,O'-bis(3-aminopropil)dietilenglicol (15)



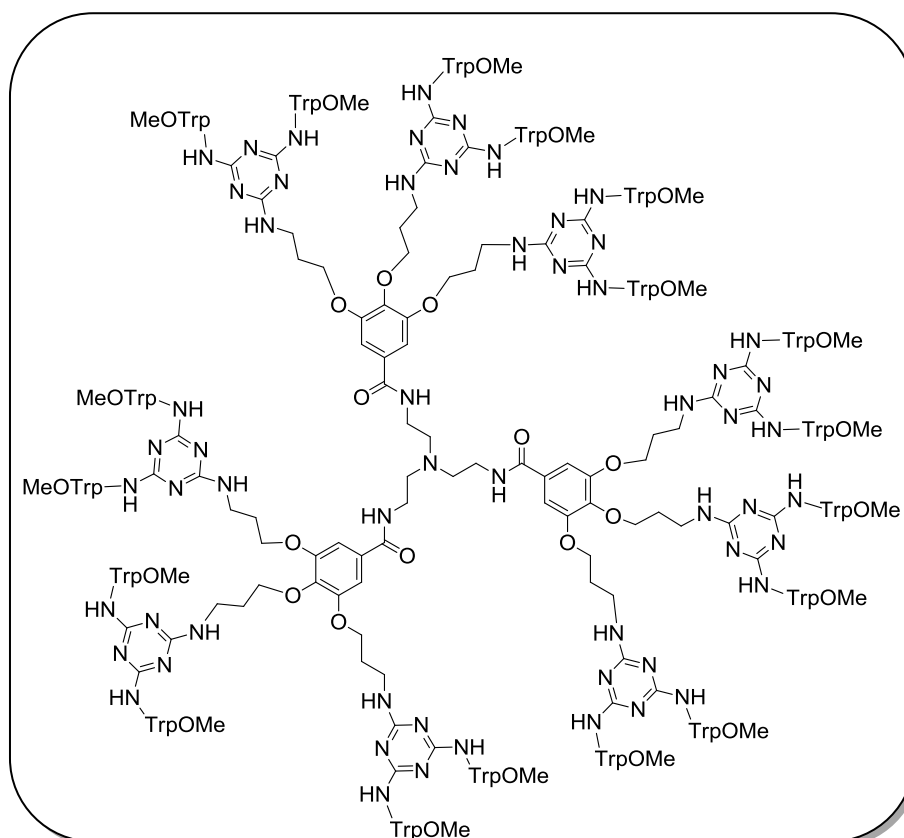
A una disolución del compuesto **12** (116 mg, 0.062 mmol), HATU (24 mg, 0.062 mmol) y DIPEA (10 mL, 0.062 mmol) en DMF (10 mL), se le añade la diamina comercial O,O'-Bis(3-aminopropil)dietilenglicol **14** (6 mg, 0.028 mmol). La mezcla se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y el crudo de reacción se concentra a sequedad. Seguidamente se añade isobutanol (30 mL) y se extrae la mezcla con H₂O (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), filtra y evapora a sequedad. A continuación, el crudo de reacción se precipita con metanol, obteniéndose 100 mg (85%) de **15** como un sirupe amarillo. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para C₂₀₄H₂₂₄N₅₀O₃₅ 3933.7285; encontrada 3933.6614. ¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD) δ: 1.78 (m, 16H, CCH₂CH₂), 3.10–3.50 (m, 52H, β-CH₂Trp, CH₂NH, OCH₂), 3.60 (s, 180H, OCH₃), 3.96 (m, 12H, OCH₂), 4.70 (m, 12H, α-CHTrp), 6.60–7.40 (m, 72 H-2ⁱTrp, Ar).

Dendrímero dodeca(OH)triptófano derivado de O,O'-bis(3-aminopropil)dietilenglicol (1)



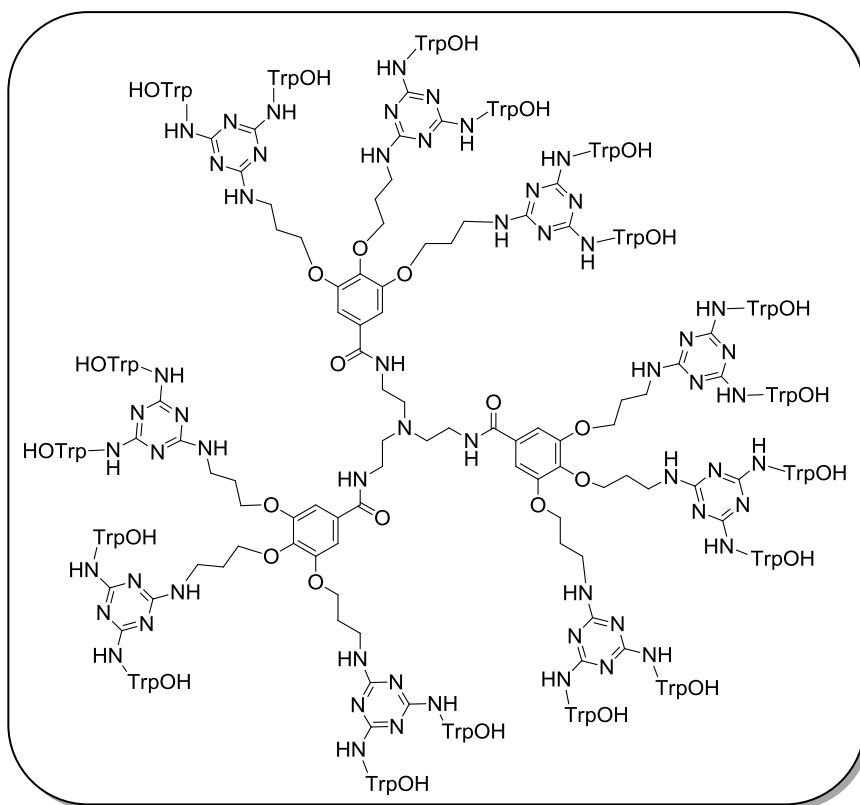
A una disolución de **15** en metanol (20 mL) se le añade una disolución de KOH 1N en metanol (4 mL, 2 mmol). La mezcla se deja reaccionar toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se adiciona ácido fórmico hasta pH 2 y se evapora el disolvente. El crudo de reacción se disuelve en isobutanol y se lava con agua (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a sequedad. El residuo se precipita con metanol, obteniéndose 50 mg (33%) de **1** como un sólido blanco; p.f.: 201-203 °C. MALDI-TOF-MS para $\text{C}_{192}\text{H}_{200}\text{N}_{50}\text{O}_{35}$ 3768.3 $[\text{M}]^+$, 3790.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. ^1H -RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 60°C) δ : 1.75 (m, 4H, CH_2CH_2), 1.91 (m, 12H, CH_2CH_2), 3.10–3.50 (m, 52H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$, CH_2NH , OCH_2), 3.96 (m, 12H, OCH_2), 4.67 (m, 12H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 6.93–7.48 (m, 78H, NH, H-2 i Trp, Ar), 8.20 (m, 2H, NH), 10.66 (s, 12H, NH-1 i Trp). ^{13}C -RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 27.78 (CH_2), 29.61 (CH_2), 30.25 (CH_2), 31.90 (CH_2), 55.05 (CH_2), 67.48 (CH_2), 68.92 (CH_2), 70.23 (CH_2), 70.49 (CH_2), 110.39 (CH), 112.02 (CH_2), 118.87 (CH), 119.05 (CH), 121.55 (CH), 124.34 (CH), 127.81 (C), 129.20 (C), 136.87 (C), 140.42 (C), 151.85 (C), 152.93 (C), 174.0 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 2-100% de A en 15 min]: 2.60 min.

Dendrímtero octadeca(OMe)triptófano derivado de tris(2-aminoetil)amina (17)



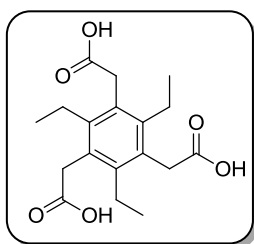
El compuesto **12** (203 mg, 0.108 mmol), HATU (41 mg, 0.328 mmol), DIPEA (0.02 mL, 0.016 mmol) en DMF (10 mL) y la triamina comercial tris(2-aminoetil)amina **16** (5 mg, 0.033 mmol) se hacen reaccionar siguiendo el mismo procedimiento que en el descrito para **15**, obteniéndose 150 mg (88%) de **17** como un sirupe amarillo que se utiliza directamente en el paso siguiente de desprotección. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para $C_{297}H_{319}N_{77}O_{47}$ 5715.4939; encontrada 5715.4853.

Dendrímico octadeca(OH)triptófano derivado de tris(2-aminoetil)amina (2)



Una disolución del compuesto **17** (150 mg, 0.026 mmol) se desprotege siguiendo el mismo procedimiento que para el compuesto **1**. El residuo se precipita en DMF, obteniéndose 50 mg (56%) de **2** como un sólido blanco; p.f. 294-296 °C. MALDI-TOF-MS para $C_{279}H_{282}N_{76}O_{48}$ 5467.0. 1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 1.73 (m, 18H, CH_2CH_2), 2.50 (m, 6H, CH_2N), 3.10–3.53 (m, 42H, β - CH_2 Trp, CH_2NH), 3.93 (m, 18H, OCH_2), 4.59 (m, 18H, α -CHTrp), 6.55 (s, 6H, Ar), 6.91–7.44 (m, 117H, NH, H-2ⁱTrp, Ar), 8.48 (m, 3H, NH), 10.78 (m, 18H, NH-1ⁱTrp). HPLC [gradiente: A:B, 2-100% de A en 15 min]: 2.02 min.

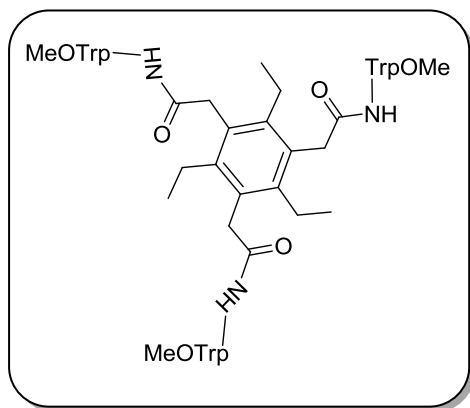
1,3,5-Tris(carboximetil)-2,4,6-trietilbenceno (a)⁸



A una mezcla de trietilbenceno (1 mL, 5.3 mmol) y paraformaldehído (1.6 g, 55.6 mmol) en HBr/AcOH (1:1) (30% en peso, 10 mL) se le añade lentamente y a temperatura ambiente bromuro de zinc (2 g, 8.7 mmol). La disolución naranja se deja reaccionar a 90° C durante la noche apareciendo un precipitado en suspensión. La reacción se enfría a temperatura ambiente, el precipitado se filtra, se lava con

agua y se seca a vacío durante la noche, para obtener 2.2 g (94%) de 1,3,5-tris(bromometil)-2,4,6-trietilbenceno como un sólido marrón.¹⁹ En un matraz se disuelve el compuesto anterior (2.0 g, 4.52 mmol) en DMF (15 mL) y se añade NaCN (2.0 g, 40.01 mmol). La reacción se calienta a 90° C bajo atmósfera de argón durante la noche. A continuación el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo resultante se disuelve en acetato de etilo (30 mL), se lava con H₂O (3 x 30 mL) y con disolución saturada de NaCl. Las fases orgánicas se evaporan a vacío, obteniéndose 1.01 g (86%) de 1,3,5-tris(cianometil)-2,4,6-trietilbenceno **19** como un sólido de color vainilla; p.f. 209-211 °C (*lit.* 208-210°C)¹⁹ A una disolución del compuesto anterior (280 mg, 1.00 mmol) en ácido clorhídrico concentrado (10 mL) se le añade lentamente ácido acético glacial (10 mL). La disolución se calienta a reflujo durante la noche, y a continuación se elimina el disolvente a vacío. El residuo se tritura con acetona y el precipitado resultante se tritura con éter, obteniéndose 301 mg (89%) de 1,3,5-tris(carboximetil)-2,4,6-trietilbenceno (**20**) como un sólido blanco. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la bibliografía.⁸

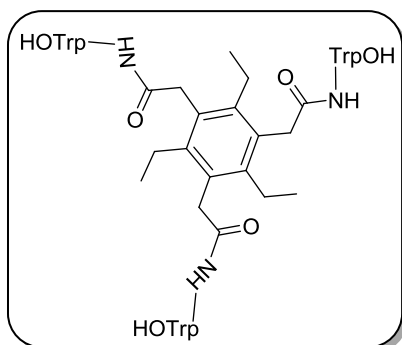
1,3,5-Tris[*N*-[1-(*S*)-(metoxicarbonil)-3-indoliletil]carbamoilmetil]-2,4,6-trietilbenceno (20**)**



A una disolución de ácido 1,3,5-tris(carboximetil)-2,4,6-trietilbenceno **a**⁸ (100 mg, 0.3 mmol) en DMF (20 mL) se le añade H-Trp-OMe.HCl (397 mg, 1.2 mmol), HCTU (496 mg, 1.2 mmol) y DIPEA (494 µL, 3.6 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Se evapora el disolvente a vacío y el crudo de reacción

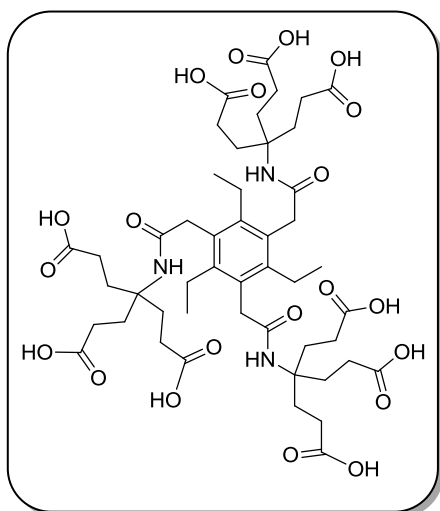
se lava sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (3 x 30 mL), disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 30 mL) y NaCl (1 x 30 mL). La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), filtra y evapora a sequedad. El residuo resultante se purifica mediante HPFC, usando DCM/metanol (100:0→20:1) como eluyente, obteniéndose 87 mg (25%) de **20** como un sólido amarillo amorfo. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, CH₃CH₂), 2.24 (m, 6H, CH₂CH₃), 3.19 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, β-CH₂Trp), 3.49 (s, 6H, CH₂CO), 4.87 (m, 3H, α-CHTrp), 5.02 (s, 6H, OCH₂), 6.97-7.49 (m, 30H, Ar), 8.49 (s, 3H, NH).

1,3,5-Tris[*N*-[1-(*S*)-(hidroxicarbonil)-3-indoliletil]carbamoilmetil]-2,4,6-trietilbenceno (21)



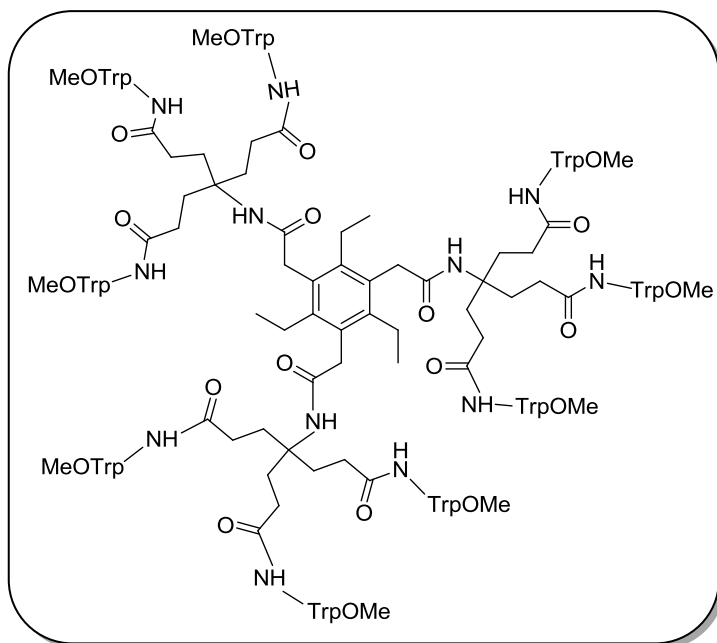
Una disolución del compuesto **20** anterior (87 mg, 0.1 mmol) en THF/metanol (1:1, 10 mL) se desprotege siguiendo el método general para la desprotección de los ésteres metílicos. El compuesto se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetonitrilo/agua 0→100) obteniendo 34 mg (50%) de **21** como un sólido de color rosa; p.f. 318-317 °C. EM (ESI, positivo): m/z 896 ($M+H$)⁺, 897 ($M+2H$)⁺. ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ : 0.70 (t, 9H, CH₃CH₂), 1.98 (m, J = 7.4 Hz, 6H, CH₃CH₂), 3.14 (m, 3H, β -CH₂Trp), 3.38 (dd, J = 14.9 Hz y J = 4.7 Hz, 3H, β -CH₂Trp), 3.46 (m, 6H, CH₂CO), 4.87 (m, 6H, α -CHTrp), 7.06 (s, 3H, H-2^{Trp}), 7.16 (t, J = 7.5 Hz, 3H, Ar), 7.28 (t, J = 7.5 Hz, 3H, Ar), 7.54 (d, J = 8.2 Hz, 3H, Ar), 7.67 (d, J = 8.2 Hz, 3H, Ar), 8.02 (m, 3H, NH). ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 14.89 (CH₃), 29.12 (CH₂), 36.46 (CH₂), 55.38 (CH), 104.73 (CH), 112.48 (CH), 120.33 (CH), 133.35 (C), 142.89 (C), 146.38 (C), 167.78 (C=O), 179.90 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 7.54 min.

Dendrímero nonaácido derivado de ácido 1,3,5-Tris(carboximetil)-2,4,6-trietilbenceno (24a)



El ácido 1,3,5-Tris(carboximetil)-2,4,6-trietilbenceno **a**⁸ (400 mg, 1.2 mmol), dendrón aminotriéster comercial **22** (1.99 g, 4.8 mmol), HATU (1.8 g, 4.8 mmol) y DIPEA (2.6 mL, 14.4 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar según el método general A para obtener 1.28 g (99%) de **24a** como un sólido de color vainilla; p.f.: 170-172 °C. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para C₄₈H₆₉N₃O₂₁ 1023.4424; encontrada 1023.4460. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0.98 (m, 9H, CH₃CH₂), 1.75 (m, 18H, CCH₂CH₂), 2.19 (m, 18H, CCH₂CH₂), 2.52 (m, 6H, CH₂CH₃) 2.63 (s, 6H, CH₂NH).

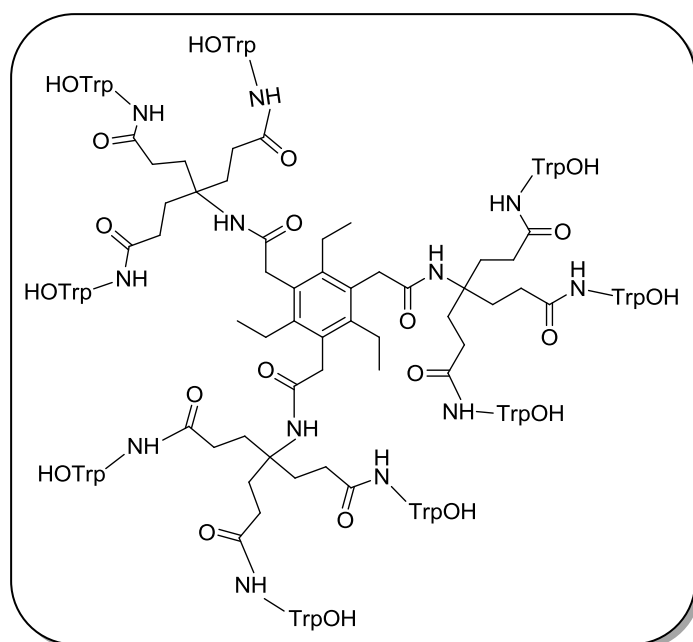
Dendrímtero nona(OMe)triptófano derivado de ácido 1,3,5-Tris(carboximetil)-2,4,6-trietilbenceno (25a)



El compuesto anterior **24a** (250 mg, 0.24 mmol), H-Trp-OMe.HCl (856 mg, 3.36 mmol), HATU (1.28 g, 3.36 mmol) y DIPEA (1.8 mL, 10.08 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC, empleando DCM/metanol (100:0→20:1) como eluyente,

obteniéndose 245 mg (36%) de **25a** como un sólido amarillo amorfo. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para $C_{156}H_{177}N_{21}O_{30}$ 2824.2970; encontrada 2824.3040. 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.25 (m, 9H, CH_3CH_2), 1.80 (m, 18H, CCH_2CH_2), 2.31 (m, 24H, CCH_2CH_2 , CH_3CH_2), 3.09 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 3.26 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 3.62 (s, 27H, OCH_3), 3.79 (m, 6H, CH_2NH), 4.74 (m, 9H, α -CHTrp), 6.99-7.47 (m, 45H, Ar), 7.98 (s, 3H, NH), 9.04 (m, 9H, NH).

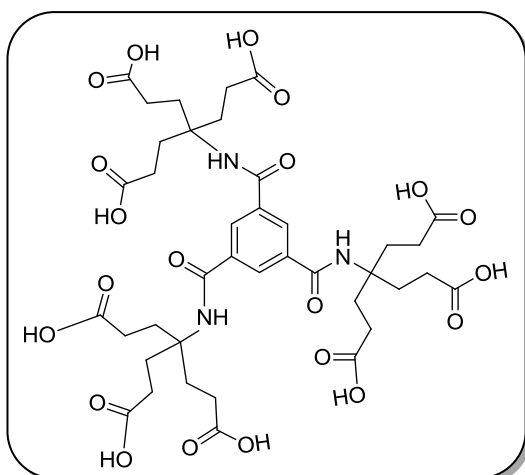
Dendrímero nona(OH)triptófano derivado de ácido 1,3,5-Tris(carboximetil)-2,4,6-trietilbenceno (26a)



El compuesto anterior **25a** (245 mg, 0.09 mmol) se desprotege según el método general de desprotección de ésteres metílicos. El residuo se purifica mediante HPFC (acetonitrilo/agua 0→100) obteniéndose 100 mg (43%) de **26a** como un sólido blanco amorfo. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para

$C_{147}H_{159}N_{21}O_{30}$ 2698.1562; encontrada 2698.1543. 1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.91 (m, 9H, CH_3CH_2), 1.67 (m, 24H, CCH_2CH_2), 1.97 (m, 18H, CCH_2CH_2), 2.47 (m, 6H, CH_3CH_2), 3.12 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 3.29 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 3.51 (s, 6H, CH_2NH), 4.7 (m, 9H, α -CHTrp), 6.96 (m, 9H, Ar), 7.03 (m, 9H, Ar), 7.08 (s, 9H, Ar), 7.28 (d, $J = 7.9$ Hz, 9H, Ar), 7.55 (d, $J = 7.9$ Hz, 9H, Ar), 8.17 (s, 9H, NH), 10.29 (sancho, 9H, NH- 1^i Trp). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 14.18 (CH_3), 22.49 (CH_2), 23.59 (CH_2), 27.57 (CH_2), 29.93 (CH_2), 30.59 (CH_2), 47.24 (CH), 54.10 (CH), 110.10 (C), 111.45 (CH), 118.35 (CH), 118.81 (CH), 121.41 (CH), 123.69 (CH), 127.63 (C), 136.89 (C), 174.19 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 8.20 min.

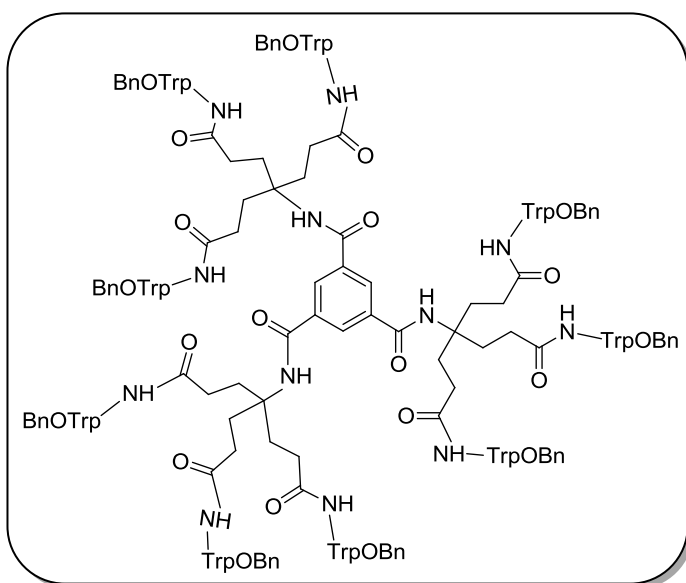
Dendrímero nonaácido derivado de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico (**24b**)¹⁰



El ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico **b** (400 mg, 1.9 mmol), dendrón aminotriéster comercial **22** (2.76 g, 6.65 mmol), HATU (2.53 g, 6.65 mmol) y DIPEA (4 mL, 22.8 mmol) en DMF (20 mL) se hacen reaccionar siguiendo el método general A, obteniéndose 1.37 g (80%) de **24b** como un sólido de color vainilla. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la

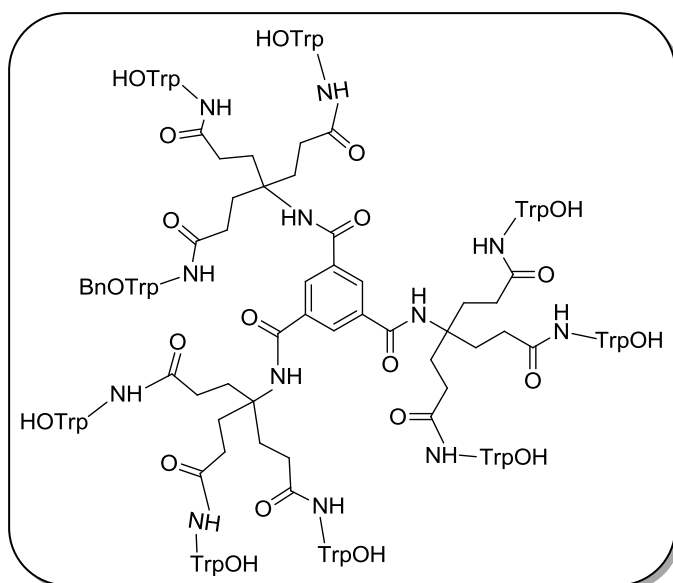
bibliografía.¹⁰

Dendrímero nona(OBn)triptófano derivado de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico (**25b**)



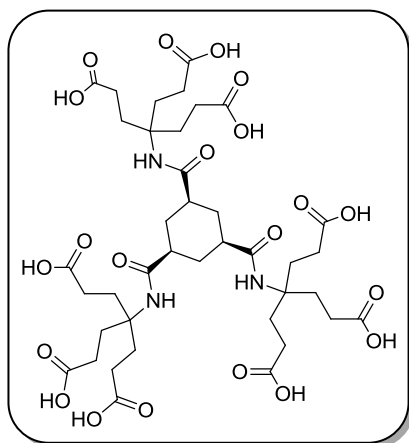
El compuesto anterior **24b** (250 mg, 0.28 mmol), H-Trp-OBzl.HCl (1.29 g, 3.9 mmol), HATU (1.48 g, 3.9 mmol) y DIPEA (2.05 mL, 11.76 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC, empleando DCM/metanol (100:0→20:1)

como eluyente, para obtener 880 mg (94%) de **25b** como un sólido amarillo amorfo. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para $C_{201}H_{195}N_{21}O_{30}$ 3382.4379; encontrada 3382.4370. 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.40 (m, 18H, CCH_2CH_2), 2.67 (m, 18H, CCH_2CH_2), 3.29 (dd, $J = 14.9$ Hz y $J = 7.8$ Hz, 9H, β - CH_2 Trp), 3.44 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 4.41 (td, $J = 7.7$ Hz y $J = 4.4$ Hz, 9H, α -CHTrp), 5.13 (dd, $J = 14.1$ Hz y $J = 2.3$ Hz, 18H, CH_2O), 5.55 (d, $J = 7.9$ Hz, 9H, NH), 7.03-7.47 (m, 90H, Ar), 8.73 (m, 6H, Ar, NH).

Dendrímero nona(OH)triptófano derivado de ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico**(26b)**

Una disolución del compuesto anterior **25b** (880 mg, 0.26 mmol) en THF/metanol (1:1, 20 mL) se desprotege según el método general de desprotección de ésteres bencílicos. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetonitrilo/agua 0→100) obteniéndose 87 mg (13%) de **26b** como un sólido

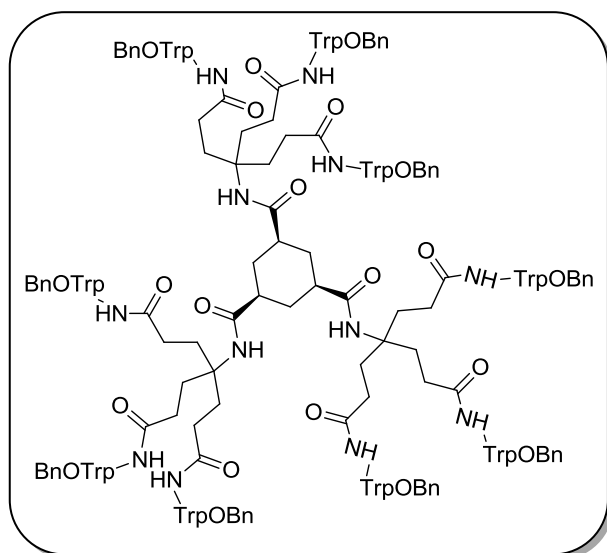
blanco amorfo. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $C_{138}H_{141}N_{21}O_{30}$ 2572.0153; encontrada 2572.0182. 1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.33 (m, 18H, CCH_2CH_2), 2.08 (m, 18H, CCH_2CH_2), 3.13 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 3.32 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 4.53 (m, 9H, α -CHTrp), 7.05 (m, 18H, Ar), 7.15 (m, 9H, Ar), 7.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 9H, Ar), 7.59 (m, 9H, Ar), 8.35 (s, 3H, Ar). ^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) δ : 13.83 (CH_2), 29.54 (CH_2), 29.66 (CH_2), 54.78 (CH), 104.97 (C), 111.57 (CH), 118.57 (CH), 118.86 (CH), 121.41 (CH), 121.44 (CH), 123.68 (CH), 127.98 (CH), 136.71 (C), 186.66 (C=O), 199.59 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 8.05 min.

Dendrímero nonaácido derivado de ácido *cis*-1,3,5-ciclohexantricarboxílico (24c)

El ácido *cis*-1,3,5-ciclohexantricarboxílico **c** (200 mg, 0.93 mmol), dendrón aminotriéster comercial **22** (1.5 g, 3.72 mmol), HATU (1.4 g, 3.72 mmol) y DIPEA (2 mL, 11.16 mmol) en DMF (20 mL) se hacen reaccionar según el método general A. Finalmente se obtuvieron 784 mg (94%) de **24c** como un sólido de color vainilla. p.f. 247-249 °C. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $C_{39}H_{57}N_3O_{21}$ 903.3485; encontrada 903.3489. 1H -

RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.78 (m, 21H, CCH₂CH₂, CH₂CH), 2.05 (m, 24H, CCH₂CH₂, CCH₂CH₂, CH₂CH, CH₂CH), 7.09 (s, 3H, NH), 11.96 (s_{ancho}, 9H, COOH).

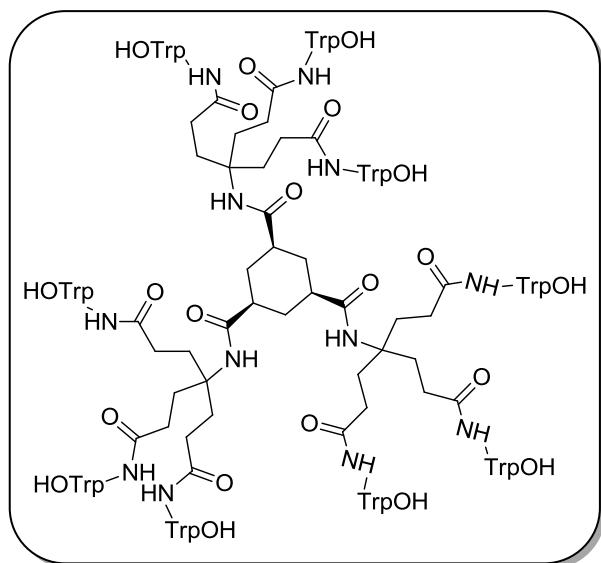
Dendrímero nona(OBn)triptófano derivado de ácido *cis*-1,3,5-ciclohexantricarboxílico (25c)



El compuesto anterior **24c** (450 mg, 0.5 mmol), H-Trp-OBzl.HCl (2.32 g, 7 mmol), HATU (2.66 g, 7 mmol) y DIPEA (3.7 mL, 21 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC, empleando DCM/metanol (100:0→20:1) como eluyente para obtener 1.46 g (86%) de **25c** como un sólido amarillo amorfo.

Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para C₂₀₁H₂₀₁N₂₁O₃₀ 3388.4848; encontrada 3388.4859. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.93-2.44 (m, 45H, CCH₂CH₂, CCH₂CH₂, CHCH₂, CHCH₂), 3.19 (m, 18H, β -CH₂Trp), 4.80 (s, 9H, α -CHTrp), 5.03 (m, 18H, CH₂Ar), 6.85-7.27 (m, 90H, Ar), 9.04 (m, 9H, NH).

Dendrímero nona(OH)triptófano derivado de ácido *cis*-1,3,5-ciclohexantricarboxílico (26c)



Una disolución del compuesto anterior **25c** (1.46 g, 0.43 mmol) en THF/metanol (1:1, 20 mL) se desprotege siguiendo el método general de desprotección de ésteres bencílicos. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetonitrilo/agua 0→100) obteniéndose 53 mg (5%) de **26c** como un sólido blanco amorfo.

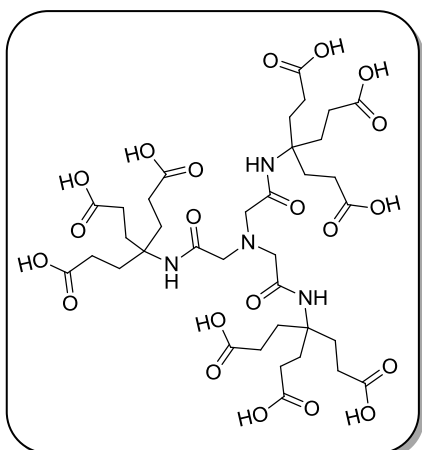
Masas Exactas (ESI, negativo): m/z

calculada para $C_{138}H_{147}N_{21}O_{30}$ 2578.0623; encontrada 2578.0663. 1H -RMN (400 MHz, CD_3OD)

δ : 1.45 (m, 3H, $CH_{2ciclohexano}$), 1.82 (m, 18H, CCH_2CH_2), 2.06 (m, 18H, CCH_2CH_2), 2.10 (m, 3H, $CH_{2ciclohexano}$), 3.13 (m, 9H, $\beta-CH_2Trp$), 3.25 (m, 9H, $\beta-CH_2Trp$), 4.09 (m, 3H, CH), 4.61 (m, 9H, $\alpha-CHTrp$), 6.99 (t, $J = 7.8$ Hz, 9H, Ar), 7.05 (t, $J = 7.3$ Hz, 9H, Ar), 7.15 (s, 9H, Ar), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 9H, Ar), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 9H, Ar). ^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) δ : 16.74 (CH_2), 29.87 (CH_2), 32.32 (CH_2), 43.95 (CH_2), 45.01 (CH), 54.09 (C), 56.22 (CH), 104.95 (C), 111.24 (CH), 118.44 (CH), 118.82 (CH), 121.32 (CH), 123.59 (CH), 127.67 (C), 136.83 (C), 176.58 (C=O).

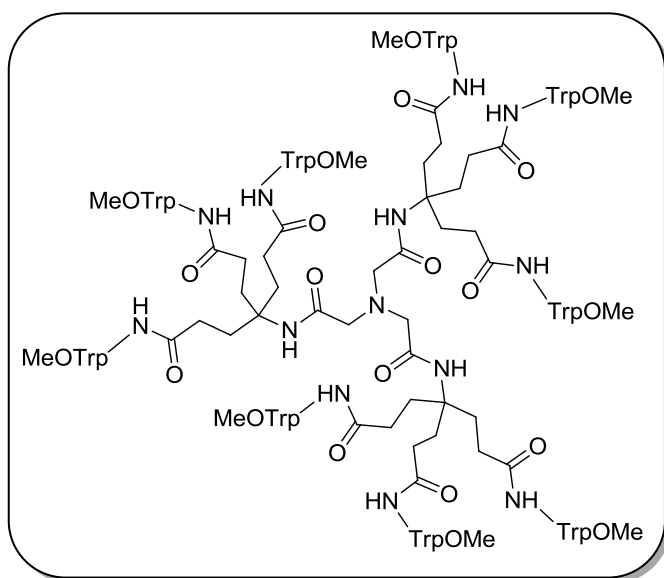
HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 8.07 min.

Dendrúmero nonaácido derivado de tris(carboximetil)amina (**24d**)⁹



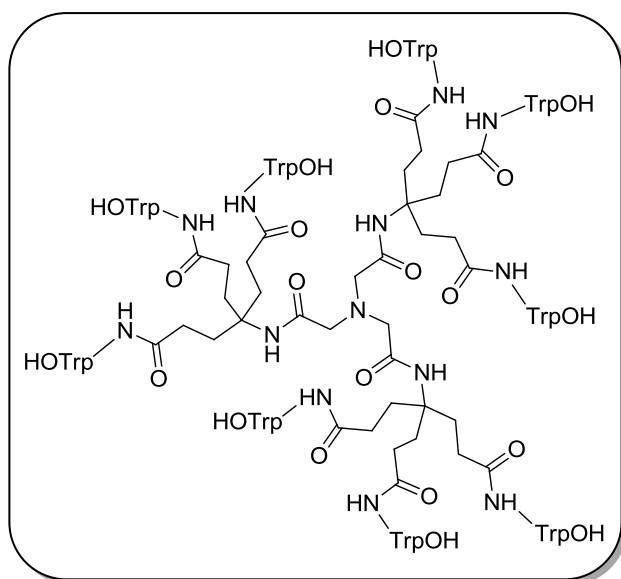
Tris(carboximetil)amina **d** (500 mg, 2.6 mmol), dendrón aminotriéster comercial **22** (3.8 g, 9.1 mmol), HATU (3.5 g, 9.1 mmol) y DIPEA (5.4 mL, 31.2 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar según el método general A. Finalmente se obtuvieron 2.13 g (93%) de **24d** como un sólido de color vainilla. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la bibliografía.⁹

Dendrúmero nona(OMe)triptófano derivado de tris(carboximetil)amina (**25d**)



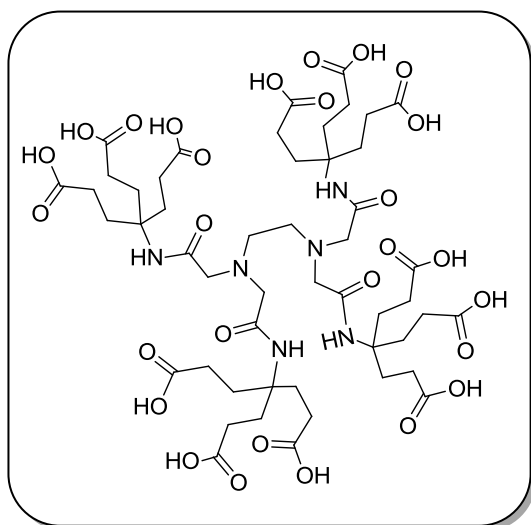
El compuesto anterior **24d** (400 mg, 0.46 mmol), H-Trp-OMe.HCl (1.64 g, 6.44 mmol), HATU (2.45 g, 6.44 mmol) y DIPEA (3.37 mL, 19.32 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC, empleando DCM/metanol (100:0→20:1) como eluyente, obteniéndose 1.00 g

(82%) de **25d** como un sólido amarillo amorfo. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para $C_{144}H_{162}N_{22}O_{30}$ 2679.1827; encontrada 2679.1739. 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.78 (m, 18H, CCH_2CH_2), 2.24 (m, 18H, CCH_2CH_2), 3.06 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 3.25 (m, 15H, β - CH_2 Trp, CH_2NH), 4.80 (m, 9H, α -CHTrp), 6.82-7.42 (m, 90H, Ar), 8.82 (sancho, 12H, NH).

Dendrímero nona(OH)triptófano derivado de tris(carboximetil)amina (26d)

Una disolución del compuesto **25d** (1.00 g, 0.34 mmol) se desprotege según el método general de desprotección de ésteres metílicos. El residuo se purifica mediante HPFC (acetonitrilo/agua 0→100) obteniéndose 46.7 mg (49%) de **26d** como un sólido blanco amorfo. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $C_{135}H_{144}N_{22}O_{30}$ 2553.0419; encontrada

2553.0437. 1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.72 (m, 18H, CCH_2CH_2), 2.01 (m, 18H, CCH_2CH_2), 2.97 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 3.11 (m, 9H, β - CH_2 Trp), 3.51 (s, 6H, CH_2NH), 4.42 (m, 9H, α -CHTrp), 6.91 (m, 9H, Ar), 6.98 (m, 9H, Ar), 7.10 (s, 9H, Ar), 7.27 (m, 9H, Ar), 7.50 (m, 9H, Ar), 8.15 (s, 9H, NH), 10.78 (sancho, 9H, NH-1 i Trp). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 14.40 (CH_2), 29.45 (CH_2), 31.37 (CH_2), 53.72 (C), 63.21 (CH_2), 69.79 (CH), 111.73 (CH), 118.66 (CH), 121.18 (CH), 123.98 (CH), 127.77 (C), 136.44 (C), 158.36 (C=O), 172.90 (C=O), 174.57 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 8.17 min.

Dendrímero dodecaácido derivado de ácido etilendiaminotetraacético (28e)

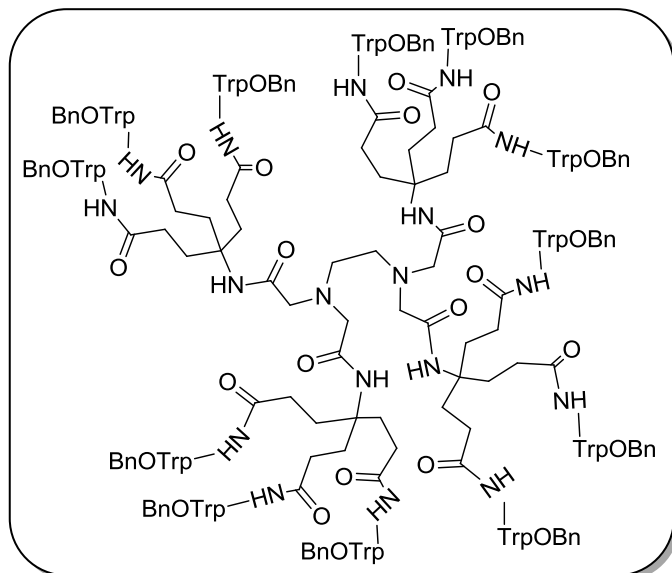
El ácido etilendiaminotetraacético **e** (EDTA) (100 mg, 0.34 mmol), dendrón aminotriéster comercial **22** (706 mg, 1.7 mmol), HATU (702 mg, 1.7 mmol) y DIPEA (711 μ L, 4.08 mmol) en DMF (20 mL) se hacen reaccionar según el método general A para obtener 340 mg (82%) de **28e** como un sólido de color vainilla; p.f.: 173-175 °C. EM (ESI, positivo): m/z 1210.3 ($M+H$) $^+$; EM (ESI,

negativo): m/z 1208.6 ($M-H$) $^-$; 1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) δ : 2.64 (m, 24H, CCH_2CH_2), 2.91 (m,

24H, CCH₂CH₂), 3.42 (s, 4H, CH₂CH₂), 3.88 (m, 8H, CH₂NH), 8.47 (m, 4H, NH). ¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD) δ: 29.62 (CH₂), 30.51 (CH₂), 53.84 (C), 57.85 (CH₂), 59.77 (CH₂), 171.17 (C=O), 175.88 (C=O).

Dendrímero dodeca(OBn)triptófano derivado de ácido etilendiaminotetraacético

(29e)

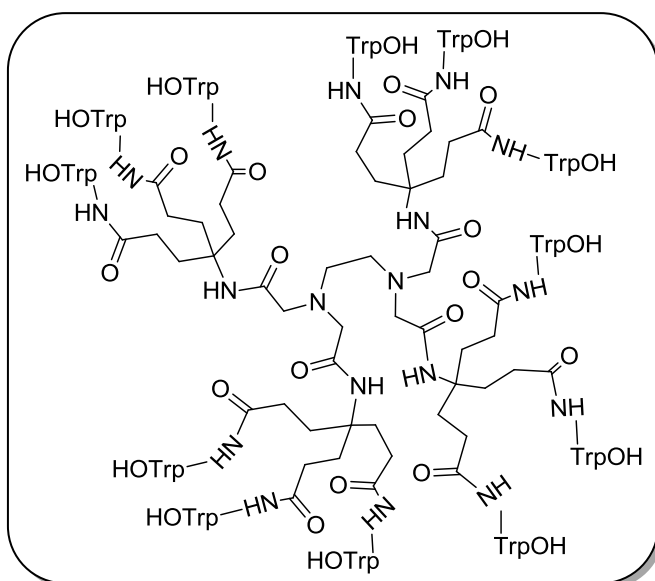


El compuesto anterior **28e** (150 mg, 0.12 mmol), H-Trp-OBzl.HCl (635 mg, 1.92 mmol), HATU (730 mg, 1.92 mmol) y DIPEA (1.00 mL, 5.76 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC, empleando DCM/metanol (100:0→20:1) como eluyente,

obteniéndose 345 mg (61%) de **29e** como un sólido amarillo amorfo. Masas *m/z* calculada para C₂₆₆H₂₆₈N₃₀O₄₀ 4521.9859; encontrada 4521.9927. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.46 (m, 24H, CCH₂CH₂), 2.76 (m, 28H, CCH₂CH₂, CH₂CH₂), 3.31-3.38 (m, 20H, β-CH₂Trp, CH₂NH), 3.50 (dd, 12H, β-CH₂Trp), 4.44 (m, 12H, α-CHTrp), 5.19 (d, 24H, OCH₂), 5.76 (d, J = , 4H, NH), 7.07-7.50 (m, 120H, H-2^lTrp, Ar), 8.02 (s, 12H, NH).

Dendrímico dodeca(OH)triptófano derivado de ácido etilendiaminotetraacético

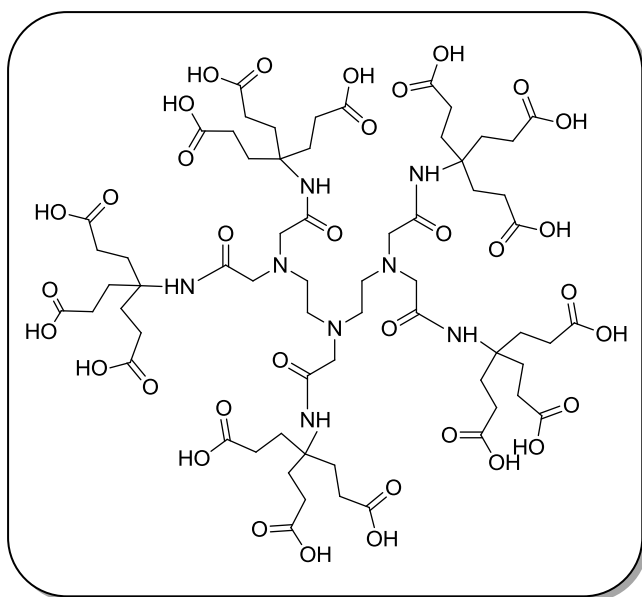
(30e)



Una disolución del compuesto anterior **29e** en THF/metanol (1:1, 15 mL) se desprotege siguiendo el método general de los ésteres bencílicos. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetonitrilo/agua 0→100), obteniéndose 162 mg (38%) de **30e** como un sólido blanco; p.f.: 285-287

°C. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $C_{182}H_{196}N_{30}O_{40}$ 3441.4225; encontrada 3441.423. 1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.79 (m, 24H, CCH_2CH_2), 2.03 (m, 24H, CCH_2CH_2), 2.62 (m, 4H, CH_2CH_2), 2.98 (m, 12H, β - CH_2 Trp), 3.13 (m, 12H, β - CH_2 Trp), 3.65 (m, 8H, CH_2NH), 4.47 (m, 12H, α -CHTrp), 6.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 12H, Ar), 6.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 12H, Ar), 7.10 (s, 12H, Ar), 7.2 (m, 12H, Ar), 7.48 (m, 12H, Ar), 8.12 (s, 12H, NH), 10.73 (s_{ancho} , 12H, $NH-1^i$ Trp). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.64 (CH_2), 29.84 (CH_2), 30.53 (CH_2), 53.76 (CH_2), 110.34 (C), 111.77 (CH), 118.63 (CH), 118.79 (CH), 121.27 (CH), 124.04 (CH), 127.66 (C), 136.45 (C), 172.86 (C=O), 174.12 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 8.99 min.

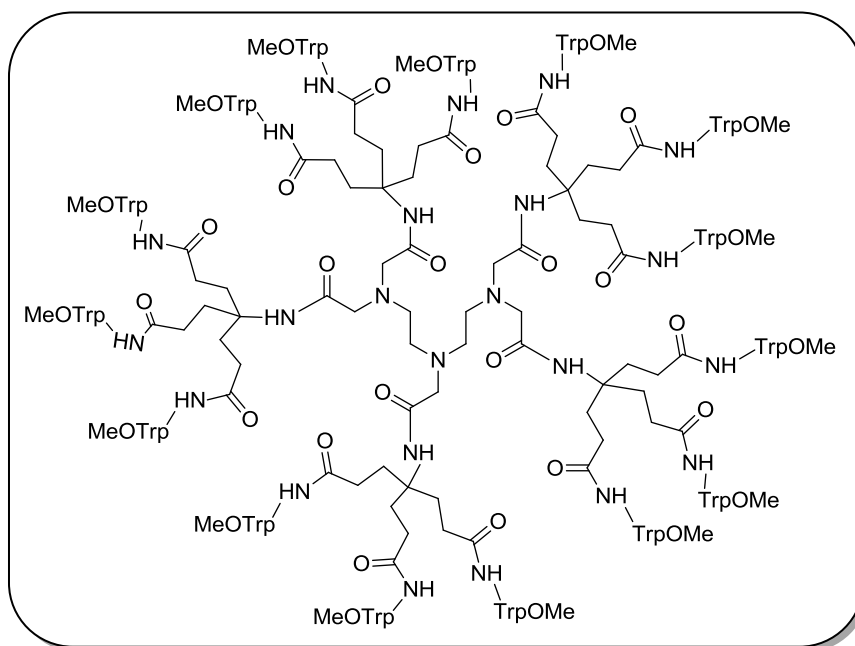
Dendrímero pentadecaácido derivado de penta(carboximetil)dietilentriamina (28f)



El compuesto anterior penta(carboximetil)dietilentriamina comercial **f** (DTPA) (400 mg, 1.02 mmol), dendrón aminotriéster comercial **22** (2.54 g, 6.12 mmol), HATU (2.37 g, 6.12 mmol), DIPEA (2.9 mL, 16.32 mmol) y DMF (20 mL) se hacen reaccionar según el método general A para obtener 688 mg (50%) de **28f** como un sólido de color

vainilla; p.f.: 184-186 °C. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $C_{64}H_{98}N_8O_{35}$ 1538.6135; encontrada 1538.6216. 1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.63 (t, $J = 7.1$ Hz, 30H, CCH_2CH_2), 2.14 (m, 8H, CH_2CH_2), 2.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 30H, CCH_2CH_2), 3.03 (s, 10H, NCH_2).

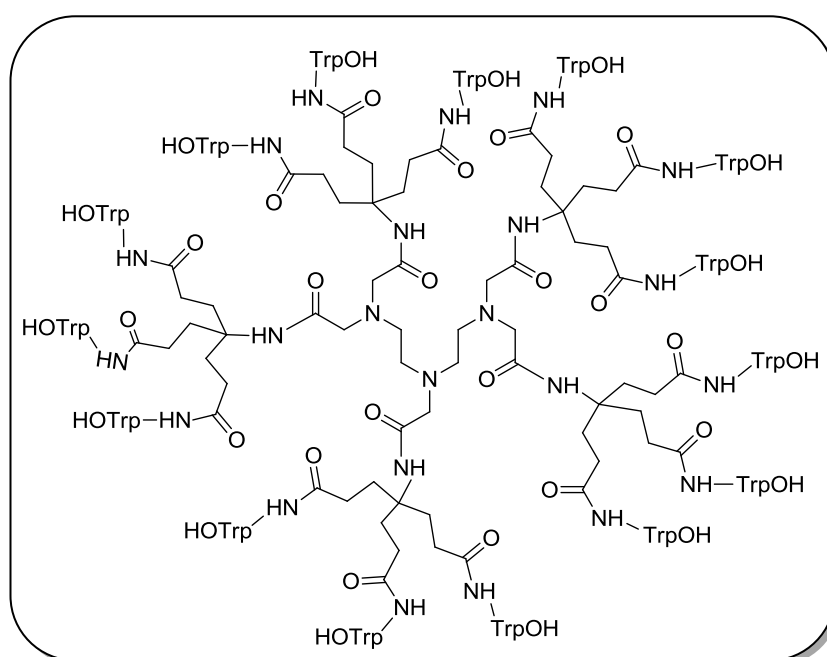
Dendrímero pentadeca(OMe)triptófano derivado de penta(carboximetil)dietilentriamina (29f)



El compuesto anterior **28f** (500 mg, 32 mmol), H-Trp-OMe.HCl (1.71 g, 6.72 mmol), HATU (2.60 g, 6.72 mmol) y DIPEA (3.7 mL, 20.16 mmol) en DMF (20 mL) se hacen reaccionar

según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC empleando DCM/metanol (20:1) como eluyente para obtener 771 mg (60%) de **29f** como un sólido amarillo amorfo. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para $C_{244}H_{278}N_{38}O_{50}$ 4540.0379; encontrada 4540.0424. 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.43 (m, 30H, CCH_2CH_2), 1.94 (m, 30H, CCH_2CH_2), 2.18 (m, 8H, CH_2CH_2), 3.28 (m, 30H, β - CH_2 Trp), 3.49 (s, 10H, NCH_2), 3.67 (m, 45H, OCH_3), 4.88 (m, 15H, α -CHTrp), 6.95-7.49 (m, 75H, H-2ⁱTrp, Ar), 8.77 (m, 15H, NH).

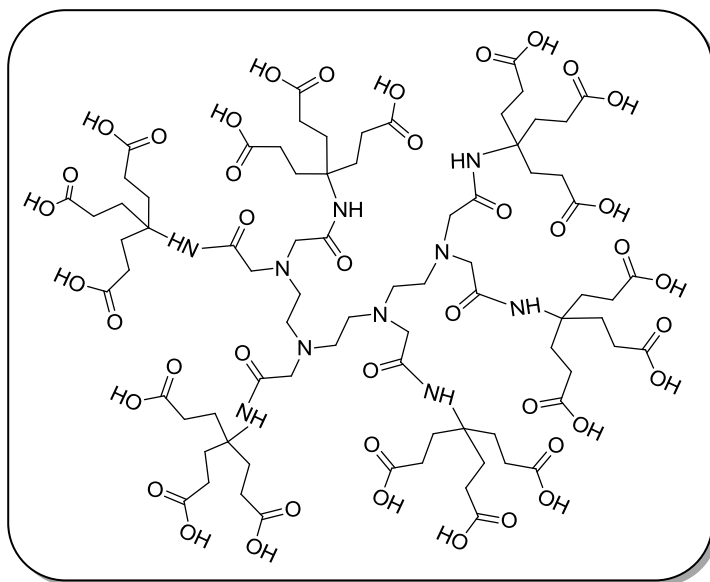
**Dendrímero pentadeca(OH)triptófano derivado de
penta(carboximetil)dietilentriamina (30f)**



Una disolución del compuesto anterior **29f** (1.56 g, 0.34 mmol) se desprotege según el método general de desprotección de ésteres metílicos. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetonitrilo/agua) obteniéndose 352 mg (24%) de **30f** como un sólido blanco amorfo. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $C_{229}H_{248}N_{38}O_{50}$ 4329.8032; encontrada 4329.8070. 1H -RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 1.75 (m, 30H, CCH_2CH_2), 2.05 (m, 38H, CCH_2CH_2 , CH_2CH_2), 2.99 (m, 25H, β - CH_2 Trp, CH_2NH), 3.13 (m, 15H, β - CH_2 Trp), 4.49 (q, J = 7.7 Hz y J = 7.1 Hz, 15H, α -CHTrp), 6.90 (t, J = 7.6 Hz, 15H, Ar), 6.97 (t, J = 7.6 Hz, 15H, Ar), 7.09 (s, 15H, Ar), 7.26 (d, J = 7.9 Hz, 15H, Ar), 7.48 (d, J = 7.9 Hz, 15H, Ar), 8.09 (s, 15H, NH), 10.72 (s_{ancho} , 15H, NH-1ⁱTrp), 12.55 (s_{ancho} , 15H, COOH). ^{13}C -RMN (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 22.54 (CH_2), 29.22 (CH_2), 48.32 (CH_2), 67.89 (CH_2), 71.37 (CH_2), 104.11 (CH), 111.61 (CH),

118.58 (CH), 118.67 (CH), 121.34 (CH), 127.74 (C), 136.73 (C), 166.56 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 8.83 min.

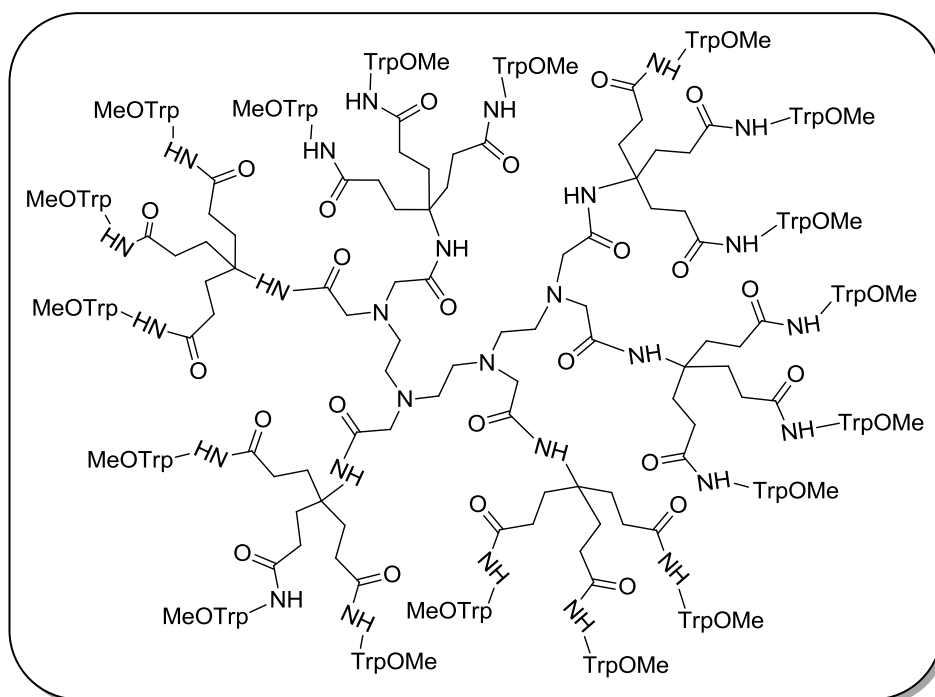
Dendrímero octadecaácido derivado de hexa(carboximetil)trietilentetraamina (28g)



A una disolución de hexa(carboximetil)trietilentetraamina **g** (500 mg, 1.01 mmol), dendrón aminotriéster comercial **22** (2.9 g, 7.07 mmol), HATU (2.69 g, 7.07 mmol) y DIPEA (3.7 mL, 21.2 mmol) en DMF (20 mL) se hacen reaccionar según el método general A para obtener 1.55 g (82%) de **28g**

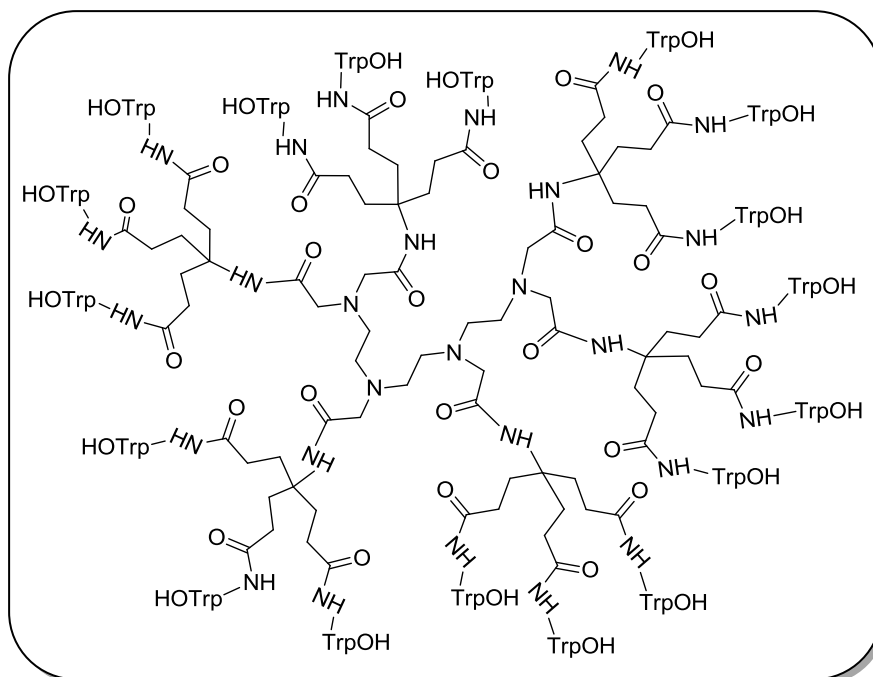
como un sirupe (sólido) de color vainilla. p.f.: 183-185 °C. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $C_{78}H_{120}N_{10}O_{42}$ 1868.7562; encontrada 1868.7542. 1H -RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 1.83 (m, 36H, CCH_2CH_2), 2.11 (m, 36H, CCH_2CH_2), 2.26 (m, 12H, CH_2CH_2), 3.08 (s_{ancho} , 12H, NCH_2).

**Dendrímero octadeca(OMe)triptófano derivado de
hexa(carboximetil)trietilentetraamina (29g)**



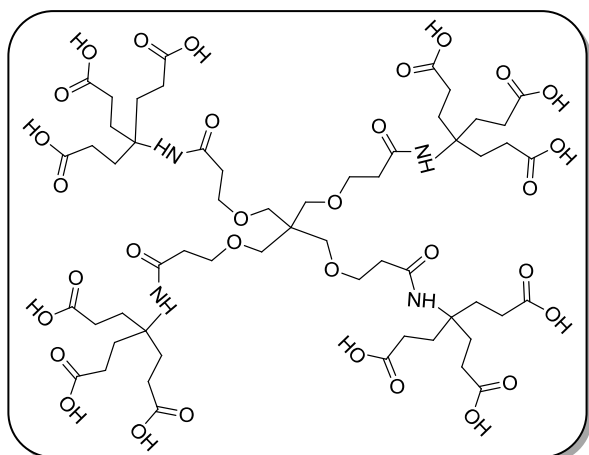
El compuesto anterior **28g** (550 mg, 0.29 mmol), H-Trp-OMe.HCl (1.99 g, 7.83 mmol), HATU (2.9 g, 7.83 mmol) y DIPEA (4.1 mL, 23.49 mmol) en DMF (20 mL) se hacen reaccionar según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC, empleando acetonitrilo/agua (0→100) como eluyente, obteniéndose 561 mg (35%) de **29g** como un sólido amarillo amorfo. Masas Exactas (ESI, positivo): m/z calculada para $C_{294}H_{336}N_{46}O_{60}$ 5470.4655; encontrada 5470.4648.

**Dendrímero octadeca(OH)triptófano derivado de
hexa(carboximetil)trietilentetraamina (30g)**



Una disolución del compuesto anterior **29g** (66 mg, 0.012 mmol) se desprotege según el método general de desprotección de ésteres metílicos. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetonitrilo/agua 0→100) obteniéndose 49 mg (78%) de **30g** como un sólido blanco amorfo. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $C_{276}H_{300}N_{46}O_{60}$ 5218.1838; encontrada 5218.1873. 1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.50-1.97 (m, 84H, CCH_2CH_2 , CCH_2CH_2 , CH_2CH_2), 2.96-3.23 (m, 48H, β - CH_2 Trp, NCH_2), 4.42 (m, 18H, α -CHTrp), 6.87-7.47 (m, 90H, Ar, H-2ⁱTrp), 7.91 (s, 18H, NH), 10.86 (s, 18H, NH-1ⁱTrp). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 24.67 (CH_2), 31.88 (CH_2), 31.97 (CH_2), 52.43 (C), 55.89 (C), 78.86 (CH_2), 80.80 (CH_2), 103.03 (C), 114.94 (C), 118.88 (CH), 122.09 (CH), 127.66 (C), 137.36 (C), 160.59 (C=O), 173.21 (C=O), 220.92 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 9.17 min.

Dendrímico dodecaácido derivado de pentaeritritol (**32**)¹⁰

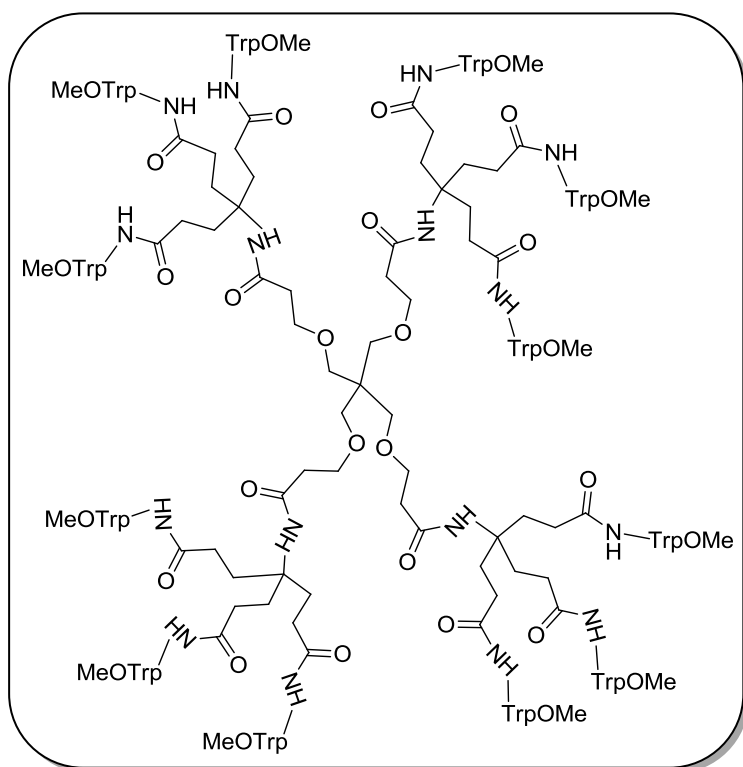


El compuesto comercial **31** (300 mg, 0.16 mmol) se disuelve en ácido fórmico (30 mL) y la disolución se calienta durante 2 días a 50°C. A continuación, el crudo de reacción se evapora a sequedad y se lava con AcOEt (3 x 30 mL), obteniéndose 197 mg (99%) de **32** como un sólido blanco. Los datos de RMN en

DMSO-*d*₆ están descritos en la literatura mientras que en CD₃OD se describen a continuación.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 2.03 (m, 24H, CCH₂CH₂), 2.32 (m, 24H, CCH₂CH₂), 2.43 (m, 8H, CH₂C), 3.65 (m, 8H, OCH₂), 3.73 (m, 8H, CH₂O).¹⁰

Dendrímico dodeca(OMe)triptófano derivado de pentaeritritol (**33**)

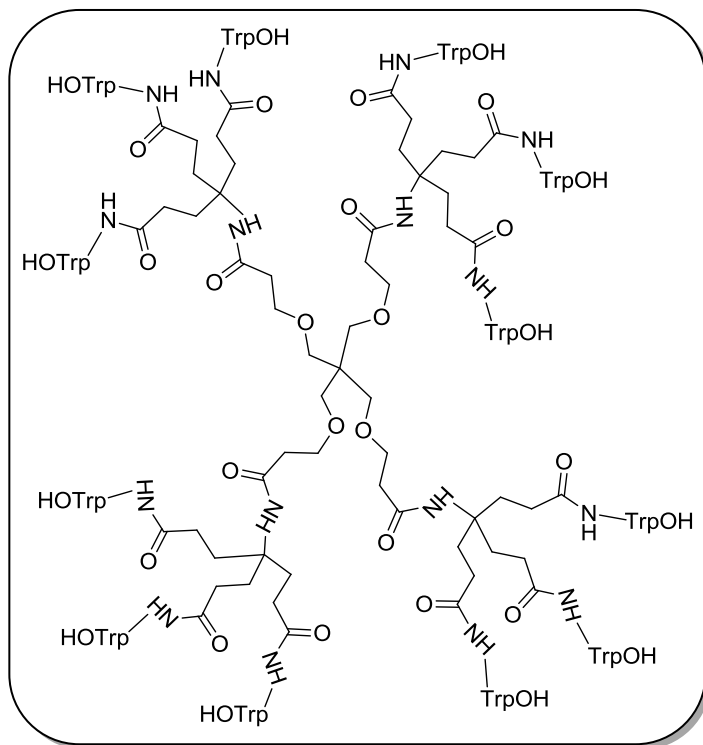


El compuesto **32** (200 mg, 0.15 mmol), H-Trp-OMe.HCl (764 mg, 3 mmol), HATU (1.14 g, 1.4 mmol) y DIPEA (1.6 mL, 9 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC, empleando DCM/metanol (20:1) como eluyente, obteniéndose 495 mg (89%) de **33** como un

sólido amarillo amorfo. Masas Exactas (ESI, positivo): *m/z* calculada para C₂₀₁H₂₃₂N₂₈O₄₄ 3741.6777; encontrada 3741.6550. ¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD) δ : 1.72 (m, 24H, CCH₂CH₂), 1.98 (m, 24H, CCH₂CH₂), 2.13 (m, 8H, OCH₂CH₂), 3.10 (m, 24H, β -CH₂Trp), 3.21 (m, 8H,

OCH_2CH_2), 3.58 (m, 8H, OCH_2), 4.73 (m, 12H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 6.99 (m, 36H, H-2ⁱTrp, Ar), 7.26 (d, J = 8.0 Hz, 12H, Ar), 7.45 (d, J = 7.8 Hz, 12H, Ar).

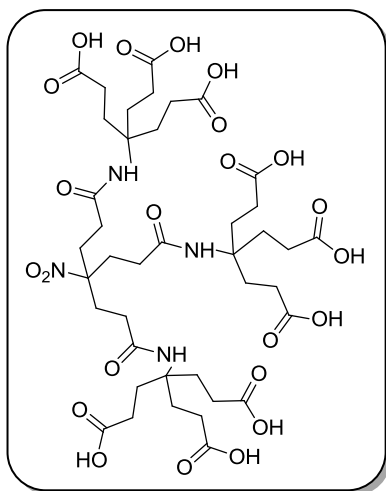
Dendrímero dodeca(OH)triptófano derivado de pentaeritritol (**34**)



Una disolución del compuesto anterior **33** (495 mg, 0.13 mmol) se desprotege según el método general de desprotección de ésteres metílicos. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetonitrilo/agua 0→100) obteniéndose 166 mg (35%) de **34** como un sólido blanco; p.f. 268-270 °C. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $\text{C}_{189}\text{H}_{208}\text{N}_{28}\text{O}_{44}$

3573.4899; encontrada 3573.4892. ^1H -RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.71 (m, 24H, CCH_2CH_2), 1.98 (m, 24H, CCH_2CH_2), 2.30 (m, 8H, OCH_2CH_2), 2.97 (m, 12H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.13 (m, 12H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.24 (m, 8H, OCH_2CH_2), 3.46 (m, 8H, OCH_2), 4.44 (m, 12H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 6.93 (t, J = 7.4 Hz, 12H, Ar), 7.00 (t, J = 7.5 Hz, 12H, Ar), 7.10 (s, 12H, H-2ⁱTrp), 7.28 (d, J = 8.0 Hz, 12H, Ar), 7.49 (d, J = 7.8 Hz, 12H, Ar), 8.06 (d, J = 7.8 Hz, 12H, NH), 10.76 (s, 12H, NH-1ⁱTrp). ^{13}C -RMN (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 27.66 (CH_2), 29.83 (CH_2), 30.56 (CH_2), 37.07 (CH_2), 45.09 (C), 53.65 (C), 57.05 (C), 68.30 (CH_2), 69.70 (CH_2), 110.42 (C), 111.79 (CH), 118.61 (CH), 118.78 (CH), 121.31 (CH), 123.99 (CH), 127.66 (C), 136.47 (C), 169.76 (C=O), 172.63 (C=O), 174.08 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 8.43 min.

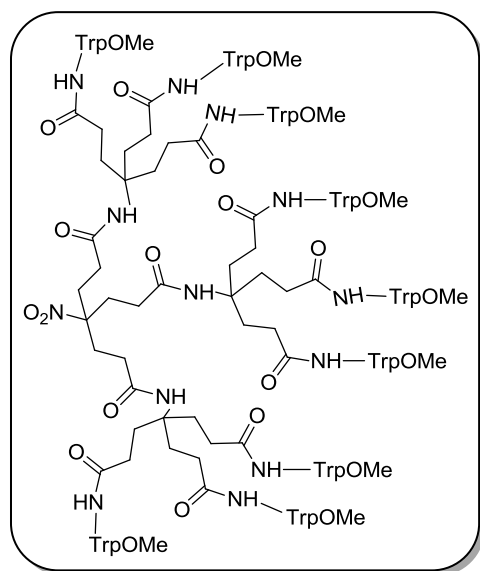
Dendrón nitrononaácido (**38**)¹¹



A una disolución que contiene el dendrón nitrotriácido **36** (500 mg, 1.80 mmol), dendrón aminotriéster comercial **22** (3.0 g, 7.21 mmol), HOBT (974 mg, 7.21 mmol) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) (1.13 mL, 7.21 mmol) en DMF (30 mL), se deja reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y el crudo de reacción se concentra a sequedad. El residuo se lava sucesivamente con disolución de ácido cítrico al 10% (3 x 30 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 30 mL) y NaCl (1 x 30 mL). La fase orgánica

se seca (Na_2SO_4), filtra y evapora a sequedad. El residuo correspondiente se disuelve en ácido fórmico (30 mL) y se calienta durante 2 días a 50°C. A continuación, el crudo de reacción se disuelve en metanol y se añade acetato de etilo hasta precipitación, obteniéndose 1.25 g (95%) de **38** como un sólido blanco. Los datos analíticos y espectroscópicos son consistentes con los descritos en la bibliografía.¹¹

Dendrón nitronona(OMe)triptófano (**39**)

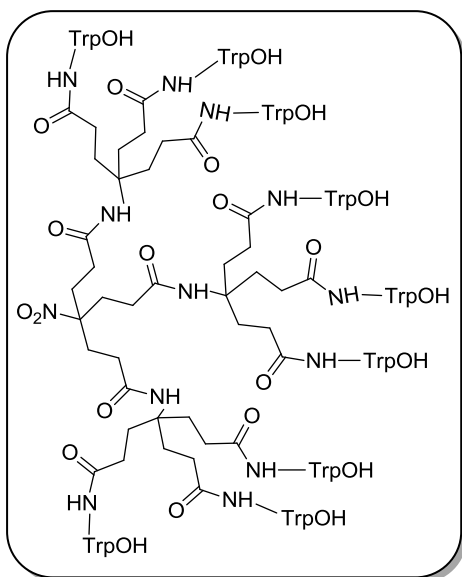


El dendrón nonaácido **38** (500 mg, 0.52 mmol), H-Trp-OMe.HCl (2.08 g, 7.3 mmol), HATU (2.62 g, 7.3 mmol) y DIPEA (3.7 mL, 21.8 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar siguiendo el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC, empleando DCM/metanol (20:1) como eluyente, obteniéndose 1.3 g (91%) de **39** como un sólido amarillo; p.f.: 210-212 °C. Masas Exactas (ESI, positivo): *m/z* calculada para $\text{C}_{148}\text{H}_{168}\text{N}_{22}\text{O}_{32}$ 2765.2195; encontrada 2765.2200. ¹H-RMN (300

MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.76 (m, 12H, CH_2), 2.06 (m, 36H, CH_2), 3.07 (m, 18H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.53 (s, 27H, CH_3), 4.49 (m, 9H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 6.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 9H, Ar), 7.04 (t, $J = 7.4$ Hz, 9H, Ar), 7.13

(m, 9H, Ar), 7.32 (d, $J = 7.6$ Hz, 9H, Ar), 7.47 (d, $J = 7.7$ Hz, 9H, Ar), 8.27 (d, $J = 7.3$ Hz, 9H, NH), 10.82 (m, 9H, NH- 1^{H} Trp). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 8.51 min.

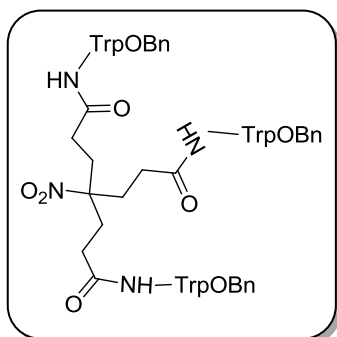
Dendrón nitronona(OH)triptófano (40)



Una disolución del compuesto anterior **39** (200 mg, 0.07 mmol) se desprotege según el método general de desprotección de los ésteres metílicos. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetonitrilo/agua 0→100) obteniéndose 80 mg (42%) de **40** como un sólido blanco; p.f. 219-221 °C. Masas Exactas (ESI, negativo): m/z calculada para $C_{139}H_{150}N_{22}O_{32}$ 2639.0787; encontrada 2639.0764. ^1H -RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.72 (m, 12H, CH_2), 2.00 (m,

36H, CH_2), 2.97 (m, 9H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.13 (m, 9H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 4.43 (m, 9H, $\alpha\text{-CHTrp}$), 6.94 (t, $J = 7.5$ Hz, 9H, Ar), 7.01 (t, $J = 7.6$ Hz, 9H, Ar), 7.10 (m, 9H, Ar), 7.29 (d, $J = 7.8$ Hz, 9H, Ar), 7.50 (d, $J = 7.8$ Hz, 9H, Ar), 8.08 (m, 9H, NH), 12.53 (s, 9H, COOH). ^{13}C -RMN (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 27.65 (CH_2), 29.78 (CH_2), 30.65 (CH_2), 53.60 (C), 57.01 (CH), 110.40 (C), 111.80 (CH), 118.59 (CH), 118.79 (CH), 121.33 (CH), 124.01 (CH), 127.64 (C), 136.49 (C), 170.52 (C=O), 172.59 (C=O), 174.06 (C=O), 204.53 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 7.96 min.

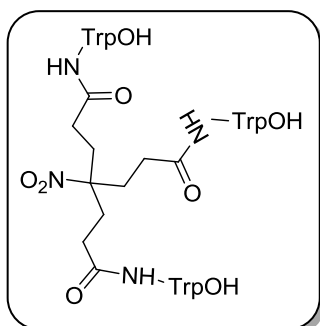
Dendrón nitrotri(OBn)triptófano (41)



El dendrón nitrotriácido **36**¹¹ (100 mg, 0.36 mmol), H-Trp-OBzl.HCl (476 mg, 1.44 mmol), HATU (678 mg, 1.44 mmol) y DIPEA (592 μL , 4.32 mmol) en DMF (20 mL), se hacen reaccionar según el método general B. El residuo se purifica mediante HPFC usando DCM/metanol (20:1) como eluyente, obteniéndose 343 mg (86%) de **41** como un sólido amarillo amorfo. EM (ESI, positivo): m/z 1107 (M)⁺. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.88 (m, 12H, CH_2CH_2), 3.23 (dd, $J = 14.8$ Hz y $J = 6.9$ Hz, 6H, $\beta\text{-CH}_2\text{Trp}$), 3.34 (dd, $J = 14.8$ Hz y $J = 5.2$ Hz,

6H, β -CH₂Trp), 4.93 (c, J = 6.6 Hz, 3H, α -CHTrp), 6.54 (m, 3H, Ar), 7.01 (m, 3H, Ar), 7.10 (d, J = 7.8 Hz, 3H, Ar), 7.29 (d, J = 8.1 Hz, 3H, Ar), 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 3H, Ar), 8.46 (s, 3H, NH).

Dendrón nitrotri(OH)triptófano (42)



Una disolución del compuesto anterior **41** (343 mg, 0.31 mmol) en THF/metanol (1:1, 20 mL) se desprotege según el método general D de desprotección de ésteres bencílicos. El residuo se purifica mediante HPFC en un sistema Biotage (acetonitrilo/agua 0→100) obteniendo 123 mg (40%) de **42** como un sólido blanco; p.f. 164-166 °C. EM (ESI, positivo): m/z 836 (M)⁺, 838 (M+2H)⁺. EM (ESI, negativo): m/z 835 (M-H)⁻, 834 (M-2H)⁻². ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.97 (m, 12H, CH₂CH₂), 2.97 (dd, J = 14.6 Hz y J = 8.5 Hz, 6H, β -CH₂Trp), 3.13 (dd, J = 14.6 Hz y J = 5.2 Hz, 6H, β -CH₂Trp), 4.41 (m, 3H, α -CHTrp), 6.94 (m, 3H, Ar), 7.01 (m, 3H, Ar), 7.10 (d, J = 7.8 Hz, 3H, Ar), 7.29 (d, J = 8.1 Hz, 3H, Ar), 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 3H, Ar), 8.15 (d, J = 7.9 Hz, 3H, NH), 10.79 (sanco, 9H, NH-1ⁱTrp). ¹³C-RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 27.62 (CH₂), 29.87 (CH₂), 31.00 (CH₂), 54.00 (C), 110.55 (C), 111.76 (CH), 118.62 (CH), 118.74 (CH), 121.28 (CH), 123.95 (CH), 127.70 (C), 136.49 (C), 170.05 (C=O), 174.03 (C=O). HPLC [gradiente: A:B, 10-100% de A en 10 min]: 7.02 min.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lozano, V.; Aguado, L.; Hoorelbeke, B.; Renders, M.; Camarasa, M.J.; Schols, D.; Balzarini, J.; San-Félix, A.; Pérez-Pérez, M.J. Targeting HIV Entry through Interaction with Envelope Glycoprotein 120 (gp120): Synthesis and Antiviral Evaluation of 1,3,5-Triazines with Aromatic Amino Acids *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (15), 5335-5348.
2. Compuestos polifuncionales basados en el anillo de 1,3,5-triazina. Síntesis y estudio de sus propiedades anti-VIH. Tesis doctoral, Virginia Lozano Rosas **2010**.
3. Tomalia, D.A.; Baker, H.; Dewald, J.R.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roek, J.; Ryder, J.; Smith, P. *A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules Polymer J.* **1985**, *17*, 117-132.
4. Fréchet, J.M.J.; Hawker, C.J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture: A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638-7647.
5. Machida, S.; Kato, N.; Ohkanda, J.; Usuba, K.; Yano, A.; Harada, K.; Blaskovich, M.A.; Sebt, S.M. Module Assembly for Protein-Surface Recognition: Geranylgeranyltransferase I Bivalent Inhibitors for Simultaneous Targeting of Interior and Exterior Protein Surfaces. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1392-1401.
6. a) Díaz-Ortiz, A.; Elguero, J.; de la Hoz, A.; Jiménez, A.; Moreno, A.; Moreno, S.; Sánchez-Migallón, A. Microwave-Assisted Synthesis and Dynamic Behaviour of N²,N⁴,N⁶-Tris(1H-pyrazolyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamines. *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 649-659. b) Moral, M.; Ruiz, A.; Moreno, A.; Díaz-Ortiz, A.; López-Solera, I.; de la Hoz, A.; Sánchez-Migallón, A. Microwave-assisted synthesis of pyrazolyl bistriazines. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 121-127.
7. Bookser, B. C.; Zhu, S. R. Solid Phase Extraction Purification of Carboxylic Acid Products from 96-Well Format Solution Phase Synthesis with DOWEX 1x8-400 Formate Anion Exchange Resin. *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 205-215.
8. O'Leary, B.M.; Szabo, T.; Svenstrup, N.; Schalley, C. A.; Lützen, A.; Schäfer, M. and Rebek, J. Jr. "Flexiball" Toolkit: A Modular Approach to Self-Assembling Capsules. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (47), 11519-11533.

9. Fernández, L., Calderón, M., Martinelli, M., Strumia, M., Cerecetto, H., González, M., Silber, J.J. and Santo, M. Evaluation of a new dendrimeric structure as prospective drugs carrier for intravenous administration of antichagasic active compounds. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, 21, 1079-1085.
10. Zhou, T., Neubert, H., Liu, D. Y., Liu, Z. D., Ma, Y. M., Kong, X. L., Luo, W., Mark, S. and Hider, R. C. Iron Binding Dendrimers: A Novel Approach for the Treatment of Haemochromatosis. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4171-4182.
11. Ornelas, C.; Broichhagen, J.; Weck, M. Strain-Promoted Alkyne Azide Cycloaddition for the Functionalization of Poly(amide)-based Dendrons and Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3923-3931.
12. Balzarini, J.; Francois, K. O.; Van Laethem, K.; Hoorelbeke, B.; Renders, M.; Auwerx, J.; Liekens, S.; Oki, T.; Igarashi, Y.; Schols, D. Pradimicin S, a highly soluble nonpeptidic small-size carbohydrate-binding antibiotic, is an anti-HIV drug lead for both microbicidal and systemic use. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 1425-1435.
13. Roboz, J.; Deng, L.; Ma, L. H. and Holland, J. F. Investigation of suramin-albumin binding by electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12, 1319-1322.
14. Hanai, T.; Miyazaki, R. and Kinoshita, T. Quantitative analysis of human serum albumin drug interactions using reverse-phased and ion-exchange liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 378, 77-82.
15. (a) Viard, M.; Parolini, I.; Rawat, S. S.; Fecchi, K.; Sargiacomo, M.; Puri, A. and Blumenthal, R. J. The role of glycosphingolipids in HIV signaling, entry and pathogenesis. *Glycoconjugate J.* **2003**, 20, 213-222; b) Seddiki, N., Ben Younes-Chennoufi, A.; Benjouad, A.; Saffar, Baumann, N.; Gluckman, J.C. and Gattegno, L. Membrane Glycolipids and Human Immunodeficiency Virus Infection of Primary Macrophage. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1996**, 12, 695-703; c) Hug, P.; Lin, H. M. J.; Korte, T.; Xiao, X. D.; Dimitrov, D. S.; Wang, J. M.; Puri, A. and Blumenthal, R. Glycosphingolipids Promote Entry of a Broad Range of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates into Cell Lines Expressing CD4, CXCR4, and/or CCR5. *J. Virol.* **2000**, 74, 6377-6385; d) Puri, A.; Hug, P.; Jernigan, K.; Rose, P. and Blumenthal, R. Role of Glycosphingolipids in HIV-1 Entry: Requirement of

- Globotriosylceramide (Gb3) in CD4/CXCR4-dependent Fusion. *Biosci. Rep.* **1999**, 19, 317;
- e) Kensinger, R. D.; Yowler, B. C.; Benesi, A. J. and Schengrund, C. L. Synthesis of Novel, Multivalent Glycodendrimers as Ligands for HIV-1 gp120. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 349-358; e) Tyssen, D.; Henderson, S. A.; Johnson, A.; Sterjovski, J.; Moore, K.; La, J.; Zanin, M.; Sonza, S.; Karellas, P.; Gianis, M. P.; Krippner, G.; Wesselingh, S.; McCarthy, T.; Gorry, P. R.; Ramsland, P. A.; Cone, R.; Paull, J. R. A.; Lewis, G. R. and Tachedjian, G. Structure Activity Relationship of Dendrimer Microbicides with Dual Action Antiviral Activity. *PLoS ONE* 2010, 5 (8), e12309; f) Chonco, L.; Pion, M.; Vacas, E.; Rasines, B.; Maly, M.; Serranía, M. J.; López-Fernández, L.; De la Mata, J.; Álvarez, S.; Gómez, R. and Muñoz-Fernández, M. A. Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *Journal of Controlled Release* **2012**, 161, 949–958; g) Vacas, E.; Arnaiz, E.; Relloso, M.; Sánchez-Torres, C.; García, F.; Pérez-Álvarez, L.; Gómez, R.; De la Mata, F. J.; Pion, M. and Muñoz-Fernández, M. A. Development of sulphated and naphthylsulphonated carbosilane dendrimers as topical microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission. *AIDS* **2013**, 27, 1219-1229.
16. Tanious, F. A.; Nguyen, B.; Wilson, W. D. Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions. *Meth. Cell. Biol.* **2008**, 84, 53-77.
17. Pauwels, R.; Andries, K.; Desmyter, J.; Schols, D.; Kukla, M. J.; Breslin, H. J.; Raeymaeckers, A.; Van Gelder, J.; Woestenborghs, R.; Heykants, J.; Schellekens, K.; Janssen, M. A. C.; De Clercq, E. and Janssen, P.A.J. Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. *Nature* **1990**, 343, 470-474.
18. Daelemans, D.; Pauwels, R.; De Clercq, E. and Pannecouque, C. A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds. *Nat. Protoc.* **2011**, 6, 925-933.
19. Walsdorff, C.; Saak, W. and Pohl, S. Synthesis of 1,3,5-tris(bromomethyl)-2,4,6-triethylbenzene – a versatile precursor to predisposed ligands. *J. Chem.Res (M)* **1996**, 1601-1609.

Capítulo 3

Dendrímeros de triptófano: Evaluación frente a la replicación de EV71

Además de los ensayos frente a VIH los compuestos descritos en el capítulo 2 fueron evaluados por el equipo del Dr. Balzarini frente a la replicación de un amplio panel de virus: Parainfluenza, Herpes simplex 1 y 2, virus corona felino y SARS (virus corona humano), siendo todos ellos inactivos.

Asimismo fueron evaluados frente a la replicación de los virus Varicela Zoster, Chikungunya, virus de la hepatitis C, enterovirus 71 por el equipo del Dr. Johan Neyts en la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica) encontrando que los compuestos mostraban actividad significativa frente a Enterovirus 71 (EV71).

Enterovirus 71

El Enterovirus 71 pertenece a la familia *Picornaviridae* (“pico” indica pequeño, y “rna” alude a que su material genético es ARN), una de las familias de virus más antigua y diversificada. Dicha familia consta de cuatro géneros, dos de ellos afectan únicamente a animales (*Cardiovirus* y *Aphtovirus*); y los otros dos (*Rinovirus* y *Enterovirus*) afectan al hombre aunque también existen serotipos que infectan a animales.

El EV71 se aisló por primera vez en 1969 en California, en pacientes que presentaban enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central. Desde entonces, han tenido lugar diversas epidemias causadas por EV71 en todo el mundo.^{1,2} Durante las pasadas dos décadas el virus ha afectado de manera especial al área Asia-Pacífico (Taiwán, China) convirtiéndose en un problema de salud pública importante en diversos países de esta zona.

La infección por EV71 es una de las causas más comunes del síndrome de mano-pie y boca en niños, que es considerada como una enfermedad leve. Sin embargo, a diferencia de otros enterovirus, el EV71 también causa síndromes neurológicos graves, tales como meningitis aséptica, encefalitis, parálisis similar a la producida por el virus de la polio e incluso la muerte, siendo los niños de corta edad especialmente vulnerables a la infección por el mismo. Es por ello que el EV71 se considera como el enterovirus capaz de producir daños neurotrópicos más graves desde la erradicación del poliovirus.

Al igual que otros enterovirus, el EV71 se transmite vía fecal-oral. Aunque la replicación del virus se focaliza fundamentalmente en el tracto gastro-intestinal también es capaz de alcanzar el sistema nervioso central, de ahí su gravedad.

El EV71 presenta su material genético como una cadena de ARN positivo y su cápsida carece de envoltura. Dicha cápsida posee una simetría de tipo icosaédrico con 60 caras organizadas en 12 pentámeros. A su vez, cada pentámero posee un eje de simetría central alrededor del cual se sitúan las proteínas VP1-VP3 de la cubierta, quedando la proteína VP4 hacia el interior (Figura 1).

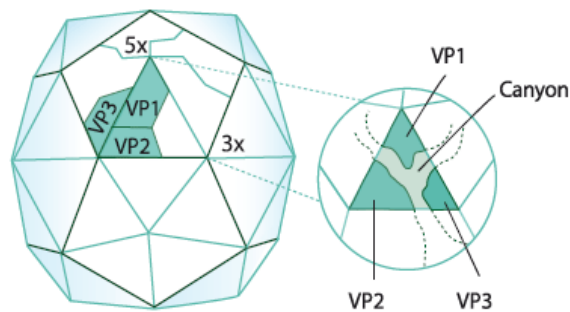


Figura 1. Estructura de la cápsida

La estructura cristalina del EV71 maduro³ reveló la existencia, en cada unidad icosaédrica, de una región alrededor del eje central (Figura 2) con carga positiva y muy expuesta al disolvente (color azul). Varios estudios indicaron que dicha región juega un papel importante en la unión al receptor celular.⁴

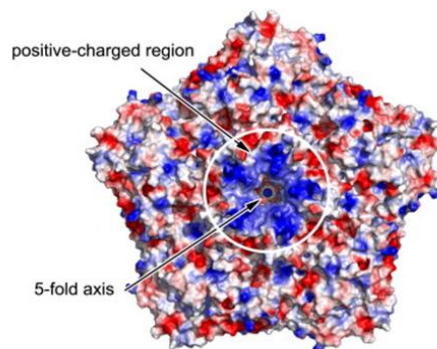


Figura 2. Superficie de potencial electrostático de una unidad icosaédrica de EV71

Ciclo replicativo del EV71

La replicación del EV71 (figura 3) se da en su totalidad en el citoplasma de la célula huésped y consta de las siguientes etapas¹:

a) Entrada del virus en las células. La infección comienza cuando el virus se une a receptores específicos situados en la superficie de la célula huésped. El sitio de unión al receptor parece ser un bolsillo hidrófobo que se encuentra en el interior de la proteína VP1 de la cápsida viral.⁵

Hasta el momento se han identificado dos glicoproteínas de membrana SCARB2 (scavenger receptor B2) y PSGL-1 (human P-selectin glycoprotein ligand-1) como receptores celulares para EV71. La proteína SCARB2 se expresa en una gran variedad de tejidos y células,⁶ mientras que la distribución de PSGL-1 está limitada a células del sistema inmunitario como leucocitos y células dendríticas. Por el momento se desconoce el papel que desempeñan ambos receptores en la célula aunque se sabe que son proteínas de membrana altamente glicosiladas.⁷

Una vez unido al receptor celular, la cápsida vírica se desestabiliza y la proteína viral VP4 que lleva unido el ARN viral se libera de la cápsida y conduce al ARN al interior de la célula.

b) Traducción del ARN viral y procesamiento de la poliproteína precursora. El ARN viral sirve de molde tanto para la traducción a proteínas como para la replicación. En primer lugar, el ARN se dirige a los ribosomas para ser traducido. El resultado de la traducción es una única poliproteína que se escinde en un paso posterior de maduración por la acción de las proteasas virales 2A y 3C (2A^{pro} y 3C^{pro}) dando lugar a las proteínas virales que se requieren para la replicación y empaquetamiento viral.⁷

c) Replicación del genoma. Para la replicación del ARN se forman vesículas dentro de la célula donde la copia (+) del ARN es reconocida por la ARN polimerasa viral (3D^{pol}) para generar la copia (-) que posteriormente vuelve a ser copiada para dar el ARN (+) de las nuevas partículas virales.

d) Encapsidación. Las proteínas estructurales (VP1, VP3 y VP0) generadas a partir del procesamiento de la poliproteína viral se unen para formar un virus inmaduro que experimenta un proceso de maduración, consistente en la escisión de la proteína VP0 en otras dos (VP2 y VP4).

e) Liberación de los viriones maduros. Por último, los viriones maduros salen al exterior mediante la destrucción de la célula huésped (ciclo lítico).

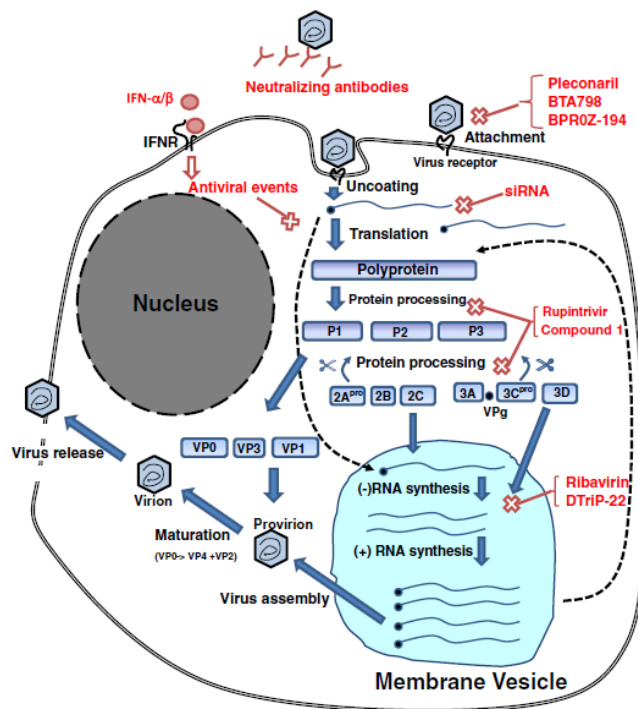


Figura 3. Ciclo replicativo del EV71

En principio, cualquiera de las fases del ciclo replicativo del EV71 supone una diana potencial para el desarrollo de compuestos capaces de frenar la replicación viral.¹ Desde el punto de vista de la diana sobre la que actúan, dichos compuestos se han clasificado en los siguientes grupos:

- Inhibidores de la entrada

Varios antivirales originalmente desarrollados para inhibir el proceso de entrada de rinovirus se han ensayado frente a EV71 debido a la similitud en el ciclo replicativo de ambos virus. Entre ellos pleconaril (Figura 4), un compuesto que se une a la cápsida de rinovirus provocando su inhibición ha demostrado también eficacia frente a distintos tipos de enterovirus, entre ellos EV71. Sin embargo la efectividad del compuesto varía en función de la cepa viral resultando por ejemplo ineficaz para inhibir la replicación de la cepa de EV71, responsable de la epidemia en Taiwán. A partir de pleconaril, y sus análogos, denominados WIN, se generó una librería virtual de compuestos cuyas conformaciones de mínima energía encajan en el

bolsillo hidrófobo de la VP1. A partir de ellos y mediante modificación química se llegó a una nueva familia de piridilimidazolidinonas que presentan actividad muy prometedora frente a EV71 dentro de la que se encuentra el compuesto BPR0Z-194 que ha demostrado ser uno de los más eficaces (Figura 4).

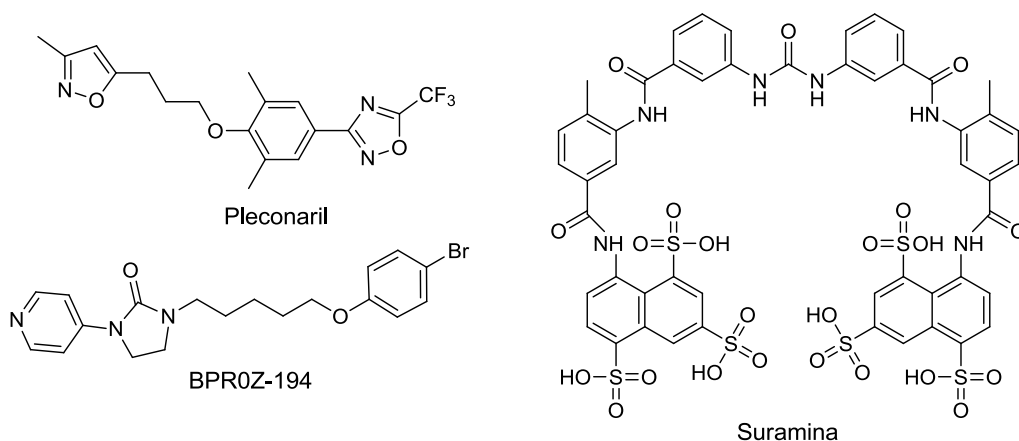


Figura 4. Estructuras de algunos inhibidores de entrada

La suramina (Figura 4), una naftilurea polisulfonada, es capaz de bloquear la proliferación del EV71 mediante unión a la cápsida viral. Aunque de momento su mecanismo de inhibición es desconocido, se cree que interacciona en la región de carga positiva de la cápsida a través de los 6 residuos sulfonato (SO_3^-) cargados negativamente presentes en su estructura.

En la actualidad el desarrollo de compuestos capaces de unirse a la proteína VP1 de la cápsida se considera una estrategia muy prometedora para la búsqueda de inhibidores de EV71 ya que como hemos dicho anteriormente dicha proteína desempeña un papel crucial en la unión del virus a los receptores celulares.

- *Inhibidores de las proteasas-3C^{pro} y 2A^{pro}*

La lista de compuestos que actúan como inhibidores de las proteasas 3C^{pro} y 2A^{pro} del EV71 abarca derivados peptídicos y peptidomiméticos como rupintrivir (Figura 5).⁸ Muchos de estos compuestos fueron desarrollados inicialmente como inhibidores de las proteasas de rinovirus⁹ y posteriormente se descubrió que también inhibían las proteasas de EV71.¹⁰

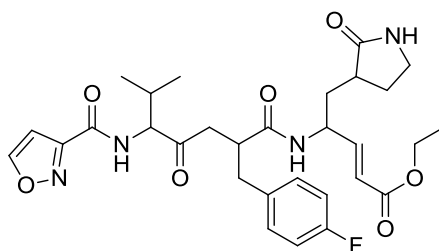


Figura 5. Estructura de Rupintrivir

En la actualidad, la información obtenida de los rayos X de la estructura cristalina de 2A^{pro} y de 3C^{pro} está siendo de gran utilidad para el diseño racional de inhibidores de dichas proteasas virales.^{10,11}

Un dato que merece la pena destacar es que a diferencia de las proteasas de otros virus, la proteasa 2A^{pro} de EV71 es capaz de escindir tanto la poliproteína viral como el factor eIF4GI, implicado en el proceso de traducción de la célula huésped, sin que la traducción de ARN viral se vea afectada.¹² Por ello, los antivirales dirigidos hacia las proteasas de EV71 no sólo deberían bloquear la maduración de la poliproteína viral, sino que también deberían proteger a las proteínas del huésped, tales como IF4GI, de la degradación por parte de las proteasas virales.

- Inhibidores de la RNA polimerasa

La maquinaria de replicación del EV71 es compleja. Si bien el papel fundamental lo desempeña la proteína viral 3D^{pol}, con una función ARN polimerasa-ARN dependiente, existen otras proteínas virales (2A-2C y 3A-3D 2C) y péptidos (VPg) que intervienen en el proceso de replicación y que ayudan a ensamblar el complejo de replicación en la superficie de las membranas vesiculares.¹³ Dada la complejidad del proceso, no es de extrañar que los inhibidores de replicación pertenezcan a familias químicas muy variadas y que en muchos casos no se conozca cual es la proteína o proteínas sobre las que actúan. Recientemente, se ha encontrado que el ácido aurintricarboxílico (ATA) (Figura 6), un conocido inhibidor del proceso de absorción del VIH que impide la interacción de la glicoproteína viral gp120 con su receptor celular CD4, inhibe la replicación de EV71 mediante la inhibición de la polimerasa 3D^{pol}.

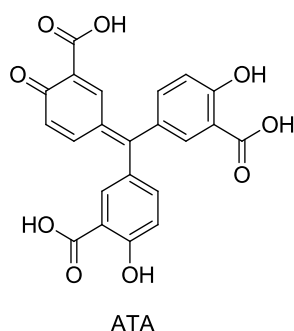


Figura 6. Inhibidor de RNA polimerasa

Los rayos X de la estructura cristalina de 3D^{pol} revelaron que dicha enzima adopta una conformación de “mano derecha-cerrada”, que se compone de dominios denominados “dedos”, “palma” y “pulgar”, similares a los que se encuentran en la transcriptasa inversa de VIH. Este hecho está siendo aprovechado para el diseño de inhibidores.

Problema de resistencia: combinación de compuestos

Debido a que el ARN genómico del EV71 es sintetizado por su RdRP (ARN polimerasa dependiente de ARN), y dicha enzima carece de función “correctora de pruebas”, el genoma vírico presenta una alta tasa de mutaciones. Por lo que es muy probable que durante el tratamiento antiviral se seleccionen variantes de EV71 que presentan fenotipos con resistencia a antivirales. Para hacer frente a este problema, el modelo de terapia combinada, empleada con éxito para el VIH, es un ejemplo a seguir. En el caso del EV71, al igual que en otras terapias combinadas, las moléculas elegidas para la combinación deben actuar a través de diferentes mecanismos. Por el momento se han encontrado varias combinaciones exitosas, entre ellas: IFN- α con rupintrivir (un inhibidor de la proteasa 3C^{pro} de EV71) o BTA798 (un inhibidor de entrada) con rupintrivir.¹⁴

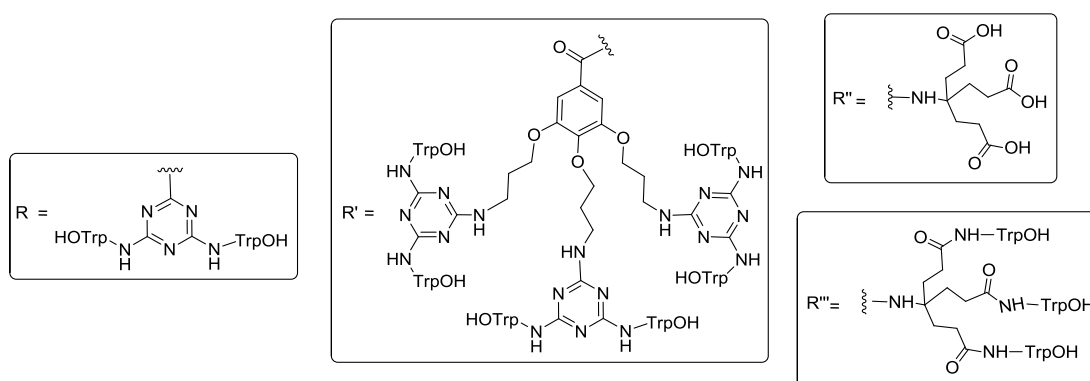
A fecha de hoy no existe ningún compuesto aprobado para el tratamiento de las infecciones causadas por los enterovirus. Esta carencia de compuestos eficaces ha motivado que se lleven a cabo amplios programas de cribado con el fin de identificar posibles prototipos.

DISCUSION DE RESULTADOS

Evaluación de los dendrímeros de triptófano frente a EV71

Tal y como se ha comentado al inicio del capítulo, la evaluación biológica de los compuestos descritos en el capítulo 2 frente a distintos virus, mostró que inhibían de forma selectiva la replicación del enterovirus 71. En la tabla 1 se recogen los datos de actividad encontrados para dichos compuestos.

Tabla 1. Actividad antiviral frente a EV71 en células RD



	EV71 EC ₅₀ (μM)	EV71 EC ₉₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	Trp n ^{os}	Triazina	Esqueleto central
1	8.4 ± 0.7	12.1	>26.5	12	SI	
2	>13.7	>13.7	-	18	SI	
13	2.1 ± 0.6	6.7 ± 5.9	> 55.8	6	SI	
24a	>97.6	-	>97.6	0	NO	
24c	>88.9	111	111	0	NO	
26a	10.3 ± 1.9	>16.6	>37	9	NO	

Tabla 1. Continuación

	EV71 EC ₅₀ (μM) ^a	EV71 EC ₉₀ (μM) ^b	CC ₅₀ (μM) ^c	n° Trp	Triazina	Esqueleto central
26b	4.3 ± 1.6	5.8 ± 1.0	13.2	9	NO	
26c	4.2 ± 0.9	5.7 ± 0.8	>38.8	9	NO	
26d	>39.1	>39.1	-	9	NO	
30e	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.2	14.1 ± 12.9	12	NO	
30f	1.9 ± 0.1	-	>23.1	15	NO	
30g	14.3	8.6	>19.2	18	NO	
34	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	24.9	12	NO	
40	0.9 ± 0.1	2.9 ± 2.7	>37.9	9	NO	
42	>120	>120	-	3	NO	

^aCE₅₀: concentración efectiva 50, es decir, concentración efectiva de compuesto que consigue proteger al 50% de las células del efecto citopático del virus.

^bCE₉₀: concentración efectiva 90, es decir, concentración efectiva de compuesto que consigue proteger al 90% de las células del efecto citopático del virus.

^cCC₅₀: concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas.

El primer dato que merece la pena destacar es que los poliácidos “desnudos” (con grupos carboxilo y sin triptófanos en la periferia) **24a** y **24c** resultaron inactivos, mientras que cuando sobre dichos compuestos se anclan triptófanos, los compuestos resultantes **26a** y **26c** sí lo fueron, si bien para estos compuestos la actividad está próxima a la toxicidad. Este hecho experimental demuestra claramente que la presencia de triptófano es crucial para la actividad anti-EV71.

Entre los compuestos de la primera serie **1**, **2** y **13**, con anillos de triazina en su estructura, tan solo **2**, con 18 residuos de triptófano en la periferia, fue inactivo. Sin embargo, el compuesto **13**, con 6 triptófanos en la periferia, fue activo. El compuesto **1**, con 12 triptófanos en la periferia, presentó una actividad próxima a la toxicidad por lo que su índice terapéutico (CC_{50}/EC_{50}) resultó <10 .

Los compuestos de la segunda serie **30e**, **30f**, **34** y **40**, sin anillos de triazina, mostraron actividad anti-EV71, resultando incluso más activos que los de la primera serie, que si presentan anillos de triazina en su estructura. Este hecho parece indicar que el anillo de triazina no es imprescindible para la actividad.

Por otra parte, el hecho de que el dendrón **42**, con tan solo 3 triptófanos en la periferia, resultase inactivo, mientras que su homólogo superior **40**, con 9 triptófanos, sí lo fuese, parece indicar que es necesario un número mínimo de triptófanos en la periferia.

Los compuestos **26a**, **26b** y **26c**, con 9 triptófanos en la periferia anclados sobre un esqueleto central cíclico con distintos grados de libertad conformacional resultaron activos mientras que **26d**, con el mismo número de triptófanos (9) y un esqueleto central no cíclico resultó inactivo. Este hecho parece indicar que un cierto grado de restricción conformacional afecta positivamente en la actividad.

Por otra parte, para los compuestos **30e**, **30f** y **30g**, con un esqueleto no cíclico muy similar, se observa que a medida que el número de triptófanos va aumentando de manera gradual (12, 15 y 18), la actividad disminuye, de lo que se deduce que para cada tipo de esqueleto hay un número óptimo de Trps por encima del cual se pierde actividad.

Merece la pena destacar que los compuestos **30e**, **34** y **40** presentaron actividad anti-EV71 a nivel submicromolar, siendo el compuesto **34**, con un anillo central de pentaeritritol, el

compuesto con mejor perfil actividad/toxicidad ($EC_{50} = 0.2 \pm 0.1 \mu M$, $CC_{50} = 24.9 \mu M$, $CC_{50}/EC_{50} = 125$) de esta familia.

Con el fin de ilustrar el efecto protector de nuestros compuestos frente a la infección por EV71, se incluyen a continuación para los compuestos que presentan mejor perfil de actividad/toxicidad **34** y **40** las gráficas dosis-respuesta en las que se representa el porcentaje de células sanas frente a la concentración de producto administrado (Figuras 7 y 8).

Así, en la gráfica dosis-respuesta obtenida para el compuesto **34** (Figura 7), se puede apreciar en verde el efecto de protección (células no infectadas) y en rojo la actividad antiviral. Dicho compuesto con un esqueleto central de pentaeritritol y 12 triptófanos en la periferia, protege al 50% de las células infectadas a una concentración de aproximadamente $0.3 \mu M$ (en rojo se muestra la actividad antiviral) y esa protección es prácticamente total entre 0.4 y $30 \mu M$. A concentraciones mayores, el número de células viables disminuye debido posiblemente a la toxicidad del compuesto a esas concentraciones.

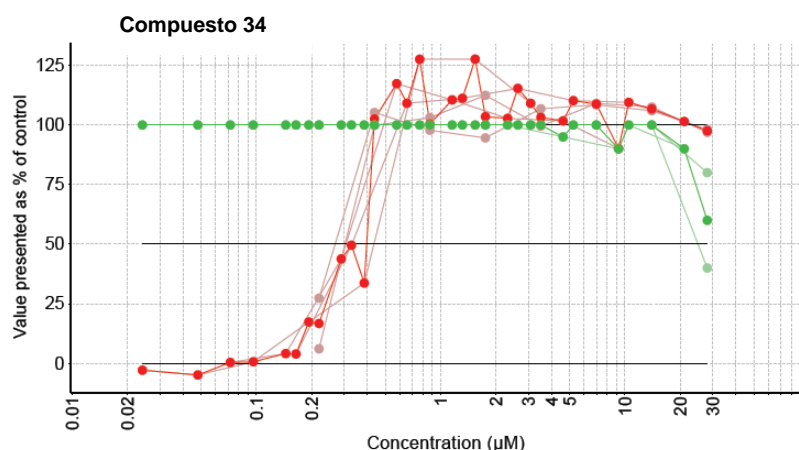


Figura 7. Efecto protector de 34 frente a la infección por EV71

Por otro lado, la gráfica obtenida para el compuesto **40**, con 9 unidades de triptófano en la periferia (Figura 8), indica una protección del 50% a una concentración de aproximadamente $0.7 \mu M$, y una protección casi total entre 1 y $8 \mu M$. Sin embargo, al ir aumentando las concentraciones entre 9 y $30 \mu M$ la protección disminuye paulatinamente hasta el 75%.

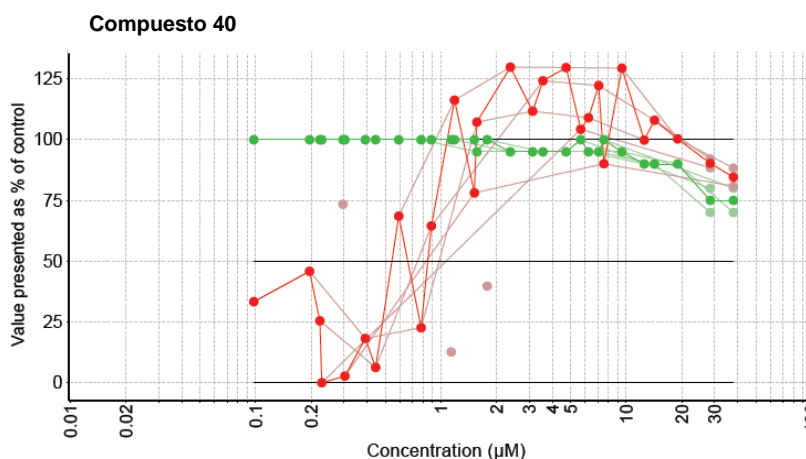


Figura 8. Efecto protector de 40 frente a la infección por EV71

El interés de los resultados obtenidos hasta el momento nos permitió considerar el compuesto **34** como un cabeza de serie novedoso en la búsqueda de compuestos activos frente a la replicación de enterovirus, más concretamente frente a EV71. Este compuesto fue el candidato seleccionado para llevar a cabo otros estudios que nos permitiesen conocer más acerca de su mecanismo de acción.

En primer lugar el compuesto **34** se ensayó frente a la replicación de otros picornavirus, los resultados obtenidos se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Actividad antirreplicativa del compuesto 34 frente a distintos picornavirus

Virus	Cepa	Células	EV71 EC ₅₀ (μM) ^a	EV71 EC ₉₀ (μM) ^b	CC ₅₀ (μM) ^c
EV71	BRCR	RD	0.259 ± 0.102	0.46 ± 0.08	24.9
CVB3	Nancy	Vero	>28	>28	>28
hRV14		Hela Rh	>28	6.71 ± 5.85	>28
ECHO11	Gregory	BGM	1.31 ± 0.265	2.88 ± 0.63	>28
PV1	Sabin	BGM	>28	>28	>28

^aCE₅₀: concentración efectiva 50, es decir, concentración efectiva de compuesto que consigue proteger al 50% de las células del efecto citopático del virus.

^bCE₉₀: concentración efectiva 90, es decir, concentración efectiva de compuesto que consigue proteger al 90% de las células del efecto citopático del virus.

^cCC₅₀: concentración citotóxica 50 o concentración de compuesto que es citotóxica para el 50% de las células no infectadas.

Tal y como se observa en dicha tabla, el compuesto **34** resultó activo frente a EV71 y ecovirus 11 (ECHO11) mientras que fue inactivo frente a otros picornavirus: coxsackie B3 (CVB3), rinovirus humano 14 (hRV14) y virus de la polio-1 (PV1), lo que indica que es un compuesto selectivo.

Una vez confirmada la actividad y selectividad frente a EV71, nos planteamos determinar en qué fase del ciclo replicativo del virus ejercían su acción dichos compuestos. Para ello se llevaron a cabo experimentos de “tiempo de adición”.

En dichos experimentos los compuestos se añadieron a células infectadas por EV71 a distintos tiempos tras el inicio de la infección, observándose que ejercen su acción en fases tempranas de la infección.

Selección de cepas virales resistentes

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, de muchos de los compuestos descritos que inhiben la replicación de EV71 se conoce cuál es su diana pero se desconoce su mecanismo de acción. Una de las aproximaciones que se emplean para establecer la diana de un compuesto antiviral es la generación de cepas resistentes al compuesto en estudio, seguido de la caracterización mediante la secuenciación de las cepas resistentes e identificación de los residuos mutados. La relevancia de esas mutaciones se confirma mediante expresión de las cepas mutantes, obtenidas por mutagénesis dirigida (crear mutaciones puntuales en una cadena de ADN) y los estudios de sensibilidad al compuesto en estudio. De este modo se puede establecer cuál es la proteína o proteínas implicadas en la acción antiviral del compuesto. Por tanto se trata de un camino largo y tedioso pero que ofrece resultados con un alto grado de fiabilidad.

El grupo del Dr. Neyts ha realizado estudios de selección de cepas resistentes frente al compuesto **34**, caracterización de las mismas y estudios de mutagénesis dirigida que podrían ayudar a establecer la diana o las dianas de la acción antiviral de **34**.

Los resultados de los que disponemos hasta el momento indican que tras varios pases de cultivo en presencia de una concentración 10 μ M de **34**, se obtuvieron dos cepas virales resistentes (P1, st1 y P1, st2) (Figura 10). Como se puede observar en la figura 9, panel 2B, la adición de 10 μ g/mL de **34** inhibe completamente la muerte celular inducida por el virus salvaje. Sin embargo, en las cepas mutadas (P1, st1 y P1, st2) tras adición de la misma concentración (Figura 10) de **34** no se observa ningún cambio como era de esperar, debido a que dichas cepas son resistentes al compuesto.

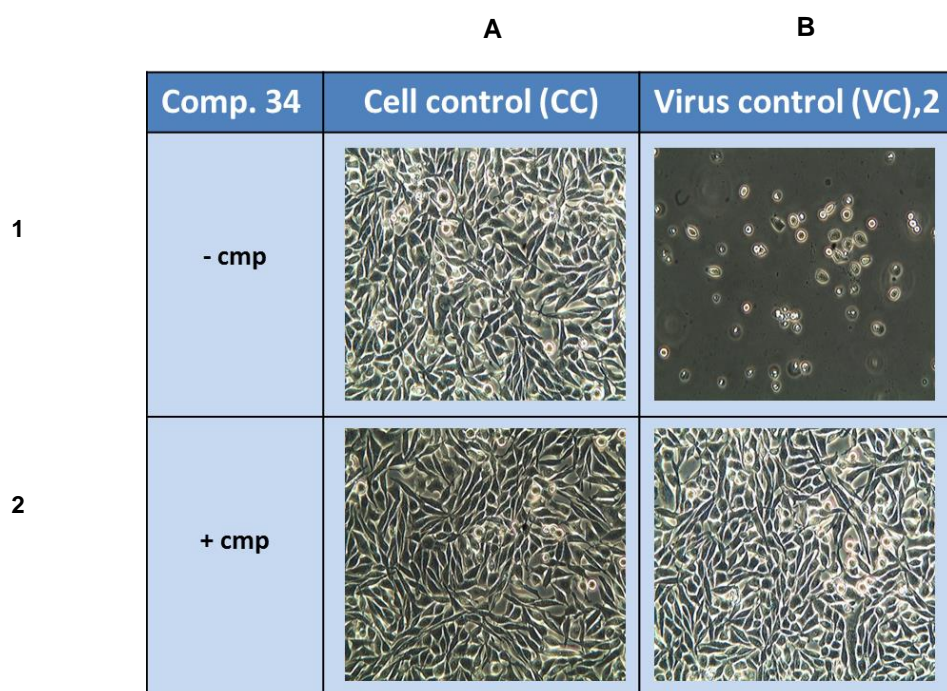


Figura 9. Células control y virus salvaje en ausencia y presencia del compuesto 34

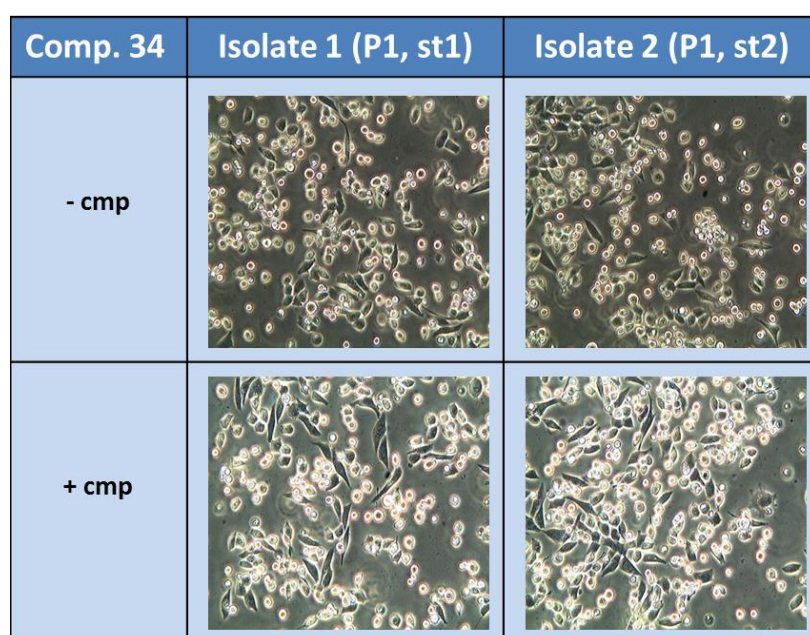


Figura 10. Cepas resistentes en ausencia y presencia del compuesto 34

La posterior caracterización de las dos cepas resistentes al compuesto **34** mediante estudios de secuenciación de ARN, mostraron la existencia de dos mutaciones que afectan a dos aminoácidos que se encuentran en las posiciones 184 y 246 de la proteína estructural VP1

situada en la cápsida. Estas dos mutaciones corresponden a la serina de la posición 184 y a la prolina de la posición 246 del virus salvaje (Figura 11), siendo reemplazadas en las cepas mutadas por treonina y serina respectivamente (Ser 184 Thr y Pro 246 Ser).

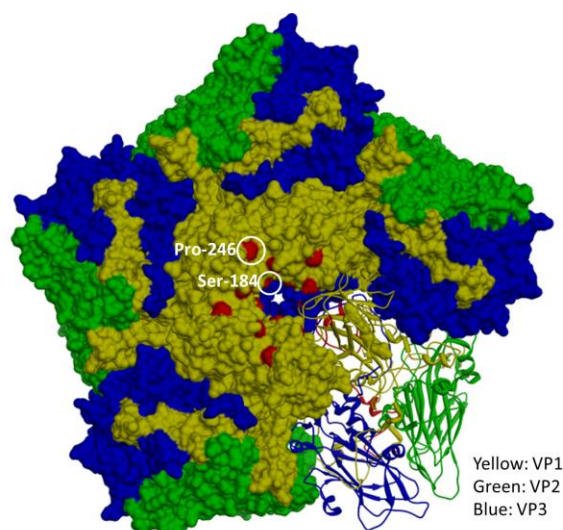


Figura 11. Mutaciones encontradas en una unidad icosaédrica de EV71

En la literatura son numerosos los ejemplos de compuestos aniónicos que interaccionan con la carga positiva de los residuos que se encuentran en la proteína VP1 de la cápsida viral.^{15,16} En base a ello, se podría postular que el carácter polianiónico de nuestros compuestos podría favorecer la interacción con aminoácidos situados en la zona positiva de la proteína VP1 de la cápsida viral, impidiendo de este modo que el virus EV71 se una a su receptor celular y en consecuencia, la entrada del virus en la célula y su posterior replicación.

CONCLUSIONES

Los dendrímeros de triptófano descritos en este capítulo fueron evaluados frente a la replicación de distintos virus, encontrándose que inhiben la replicación del enterovirus 71 de forma selectiva. A partir de este dato se iniciaron estudios para determinar el mecanismo de acción de dichos compuestos y establecer relaciones entre su estructura química y la actividad biológica. De estos estudios se podría concluir que el anillo de triazina no es imprescindible para la actividad mientras que el triptófano con su grupo ácido libre sí lo es.

Tres de los compuestos ensayados (**30e**, **34** y **40**) inhiben la replicación de EV71 a nivel submicromolar ($EC_{50} = 0.2 - 0.9 \mu M$). De todos ellos, merece la pena destacar el compuesto **34** con un esqueleto central de pentaeritritol y 12 triptófanos en la periferia. La síntesis de dicho compuesto a partir de un esqueleto central comercial requirió tan solo tres etapas sintéticas.

Los compuestos fueron ensayados frente a distintos enterovirus, encontrándose selectividad frente a EV71 y ECHO11.

Experimentos de tiempo de adición llevados a cabo con **34** indicaron que nuestros compuestos actúan en fases tempranas del ciclo replicativo, probablemente a nivel de entrada.

Para determinar el mecanismo de acción de los dendrímeros de Trp aquí descritos frente a EV71, se seleccionaron cepas resistentes e identificaron los residuos mutados. Tras varios pases de cultivo en presencia de **34**, se obtuvieron dos cepas virales resistentes. La caracterización de dichas cepas, mostraron la existencia de dos mutaciones que afectan a dos aminoácidos que se encuentran en las posiciones 184 y 246 de la proteína estructural VP1 situada en la cápsida. Estas dos mutaciones corresponden a la serina de la posición 184 y a la prolina de la posición 246 del virus salvaje, siendo reemplazadas en las cepas mutadas por treonina y serina respectivamente (Ser 184 Thr y Pro 246 Ser).

Nuestros resultados parecen indicar que estos compuestos podrían interaccionar con la región de carga positiva de la proteína VP1 de la cápsida a través de los residuos carboxilato cargados negativamente presentes en su estructura. De esta manera se impediría la interacción con el receptor celular y por tanto, la entrada del virus en la célula.

Hasta el momento no se han descrito inhibidores eficaces frente a la replicación de EV71 ni tampoco dendrímeros con actividad frente a dicho virus, por lo que podemos concluir que nuestros resultados son de gran interés y que nos encontramos ante una nueva familia de inhibidores de dicho virus. Los compuestos **30e**, **34**, y **40**, con actividad submicromolar, son buenos cabezas de serie con los que seguir trabajando, con el fin de encontrar compuestos más activos y menos tóxicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kuo, R-L. and Shih, S-R. Strategies to develop antivirals against enterovirus 71. *Virology Journal*, **2013**, 10:28, 1-8.
2. Wu, K. X.; Ng, M. M-L. and Chu, J. J. H. Developments towards antiviral therapies against enterovirus 71. *Drug Discovery Today* **2010**, 15, 1041-1051.
3. (a) Plevka, P.; Perera, R.; Cardoso, J.; Kuhn, R.J. and Rossmann M.G. Crystal Structure of Human Enterovirus 71. *Science* **2012**, 336, 1274; b) Wang, X.; Peng, W.; Ren, J.; Hu, Z.; Xu, J.; Lou, Z.; Li, X.; Yin, W.; Shen, X.; Porta, C.; Walter, T.S.; Evans, G.; Axford, D.; Owen, R.; Rowlands, D.J.; Wang, J.; Stuart, D.I.; Fry, E.E. and Rao, Z. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19, 424–429.
4. Wang, Y.; Qing, J.; Sun, Y. and Rao, Z. Suramin inhibits EV71 infection. *Antiviral Research* **2014**, 103, 1-6.
5. Shih, S.R.; Chen, S.J.; Hakimelahi, G.H.; Liu, H.J.; Tseng, Ch.J. and Shia, K.S. Selective human enterovirus and rhinovirus inhibitors: An overview of capsid-binding and protease-inhibiting molecules. *Medicinal Research Reviews* **2004**, 24, (4), 449-470.
6. Yamayoshi, S.; Ohka, S.; Fujii, K. and Koike, S. Functional Comparison of SCARB2 and PSGL-1 as Receptors for Enterovirus 71, *J. Virol.* **2013**, 87 (6), 3335-3347.
7. Rueckert, R.R. Picornavirus and their multiplication. In: Fields BN, Knipe DM (eds) *Virology*, 2nd edn. Raven Press, New York, **1990**, 507-548.
8. a) Dragovich, P.S.; Prins, T. J.; Zhou, R.; Webber, S. E.; Marakovits, J. T.; Fuhrman, S. A.; Patick, A. K.; Matthews, D. A.; Lee, C. A.; Ford, C. E.; Burke, B. J.; Rejto, P. A.; Hendrickson, T. F.; Tuntland, T.; Brown, E. L.; Meador III, J. W.; Ferre, R. A.; Harr, J. E. V.; Kosa, M. B. and Worland, S. T. Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Irreversible Human Rhinovirus 3C Protease Inhibitors. 4. Incorporation of P₁ Lactam Moieties as I-Glutamine Replacements. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1213–1224; b) Zhang, X.N. *World J. Gastroenterol.* **2010**, 16, 201–209; c) Zhang, Y.; Zhu, Z.; Yang, W.; Ren, J.; Tan, X.; Wang, Y.; Mao, N.; Xu, S.; Zhu, S.; Cui, A.; Zhang, Y.; Yan, D.; Li, Q.; Dong, X.; Zhang, J.; Zhao, Y.; Wan, J.; Feng, Z.; Sun, J.; Wang, S.; Li, D. and Xu, W. An

- emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand, foot and mouth disease in Fuyang city of China. *J. Virol.* **2010**, 7, 94, 1-9.
9. Matthews, D.A.; Dragovich, P.S.; Webber, S.E.; Fuhrman, S.A.; Patick, A.K.; Zalman, L.S.; Hendrickson, T.F.; Love, R.A.; Prins, T.J. and Marakovits, J.T. Structure-assisted design of mechanism-based irreversible inhibitors of human rhinovirus 3C protease with potent antiviral activity against multiple rhinovirus serotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96 (20), 11000–11007.
 10. Cui, S.; Wang, J.; Fan, T.; Qin, B.; Guo, L.; Lei, X.; Wang, M, and Jin, Q. Crystal structure of human enterovirus 71 3C protease. *J. Mol. Biol.* **2011**, 408 (3), 449–461.
 11. (a) Petersen, J.F.; Cherney, M.M.; Liebig, H.D.; Skern, T.; Kuechler, E. and James, M.N. The structure of the 2A proteinase from a common cold virus: a proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. *J. EMBO.* **1999**, 18 (20), 5463–5475; b) Baxter, N.J.; Roetzer, A.; Liebig, H.D.; Sedelnikova, S.E.; Hounslow, A.M.; Skern T. and Waltho, J.P. Structure and Dynamics of Coxsackievirus B4 2A Proteinase, an Enzyme Involved in the Etiology of Heart Disease. *Virol.* **2006**, 80 (3), 1451–1462.
 12. Kuechler, E In: Semler, B.L., Wimmer, E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, **2002**, 301–311.
 13. Strauss, D. M. and Wuttke, D. S. Characterization of Protein-Protein Interactions Critical for Poliovirus Replication: Analysis of 3AB and VPg Binding to the RNA-Dependent RNA Polymerase. *J. Virol.* **2007**, 81, 6369-6378.
 14. (a) Hung, H.C.; Wang, H.C.; Shih, S.R.; Teng, I.F.; Tseng, C.P. and Hsu, J.T. Synergistic Inhibition of Enterovirus 71 Replication by Interferon and Rupintrivir. *J. Infect. Dis.* **2011**, 203 (12), 1784–1790; b) Lu, J.; Yi, L.; Zhao, J.; Yu, J.; Chen, Y.; Lin, M.C.; Kung, H.F.; He, M.L. Enterovirus 71 Disrupts Interferon Signaling by Reducing the Level of Interferon Receptor 1. *J. Virol.* **2012**, 86 (7), 3767–3776; c) Thibaut, H.J.; Leyssen, P.; Puerstinger, G.; Muigg, A.; Neyts, J. and De Palma, A.M. Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus infections. *Antiviral Res.* **2011**, 90 (3), 213–217.
 15. Nishimura, Y.; Lee, H.; Hafenstein, S.; Kataoka, C.; Wakita, T.; Bergelson, J. M. and Shimizu, H. Enterovirus 71 binding to PSLG-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction. *PLOS Pathog.* **2013**, 9 (7), 1-12.

16. Nishimura, Y., Wakita, T. and Shimizu, H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog* **2010**, 6 (11), 1-9.

Conclusiones Generales

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido el diseño y síntesis de compuestos para el tratamiento de las infecciones por VIH. Para ello se ha seguido una aproximación novedosa que ha consistido en la búsqueda de moléculas capaces de interactuar con los carbohidratos presentes en la glicoproteína gp120 del VIH mediante un mecanismo similar al de las lectinas o la pradimicina A.

Para el diseño de estas moléculas se ha tenido en cuenta el tipo de interacciones que establecen las lectinas con los carbohidratos de la cubierta viral que son múltiples, de baja afinidad y de tipo no covalente, en concreto enlaces de hidrógeno, interacciones CH- π , interacciones de Van der Waals, etc.

Concretamente se han preparado dos series de compuestos. Los polifenoles de la primera serie contienen un esqueleto central de trietilbenceno sustituido con anillos aromáticos con capacidad para establecer interacciones CH- π y enlaces de hidrógeno con los carbohidratos de la cubierta del VIH. Como anillos aromáticos se emplearon en primer lugar anillos fenólicos con 2 y 3 grupos OH. Las modificaciones estructurales han consistido en variar tanto el número como la posición de los grupos hidroxilo sobre el anillo aromático, aumentar la distancia entre el esqueleto central y la periferia, sustituir el anillo fenólico por otros anillos aromáticos tales como pirrol, aminopiridina, de reconocida capacidad para establecer enlaces de hidrógeno. La unión entre el esqueleto central y los anillos aromáticos de la periferia se ha llevado a cabo mediante agentes de acoplamiento (PyBOP, HATU, etc).

Los resultados biológicos obtenidos para esta familia indican que las modificaciones estructurales llevadas a cabo no mejoraron la actividad del prototipo **AL-170**, de lo que se deduce que los requisitos estructurales son muy estrictos. Estudios de SPR “directos” (anclando la glicoproteína gp120 al chip) e “inversos” (anclando el compuesto al chip) indicaron que podría existir interacción entre dicho compuesto y los carbohidratos de la gp120, si bien no fue posible determinar la constante de afinidad.

Estudios “in vitro”, empleando los métodos FRAP, ORAC y ABTS, para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos preparados dentro de esta serie permiten concluir que los compuestos **1**, **AL-170**, **6**, **8** y **16** muestran mejores propiedades antioxidantes

que compuestos de referencia como el hidroxitirosol. Dado el enorme interés que existe en la actualidad en los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos antioxidantes las propiedades de estos compuestos pueden ser de interés.

Dentro de la segunda serie se han preparado dendrímeros con 9, 12, 15 y 18 triptófanos (Trp) en la periferia. La síntesis de dichos compuestos se ha llevado a cabo de manera muy eficaz aplicando estrategias convergentes o divergentes similares a las empleadas para la síntesis de dendrímeros. Los resultados biológicos obtenidos para los compuestos de esta segunda serie permiten concluir que inhiben significativamente la replicación del VIH y además se unen a las glicoproteínas gp120 y gp41 de la superficie viral por lo que podrían constituir eficientes inhibidores de la entrada del VIH en la célula. Además se demostró que la multivalencia es importante tanto para la actividad anti-VIH como para el reconocimiento de la glicoproteína gp120. Asimismo el anillo de triptófano con el ácido carboxílico libre resultó importante para la actividad.

Experimentos de tiempo de adición revelaron que estos compuestos inhiben eventos tempranos del ciclo replicativo del VIH lo que apoyaría la interacción con las glicoproteínas gp120 y gp41. La constante de afinidad (K_D) obtenida para el compuesto **30f** fue 6,7 μM , muy similar a la del compuesto de referencia Pradimicina A (2.7 μM).

Nuestros resultados indican que los dendrímeros de triptófano sintetizados dentro de esta segunda serie podrían interaccionar a través de las cargas negativas con regiones positivas de la superficie viral mediante un mecanismo similar al que presentan los polianiones (p.ej: suramina), si bien deben establecerse también otro tipo de interacciones adicionales en las que podría participar el anillo de indol presente en el triptófano que es importante para la actividad.

La capacidad de nuestros compuestos para actuar en etapas tempranas del ciclo replicativo del VIH, antes de que el VIH entre en la célula huésped, hace de ellos candidatos ideales para ser utilizados como microbicidas, compuestos en los que existe un gran interés, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde los medios para acceder a las terapias convencionales del mundo desarrollado son muy limitados.

Además de los ensayos frente a VIH los compuestos preparados fueron evaluados frente a la replicación de un amplio panel de virus. Los resultados obtenidos indicaron que los

dendrimeros de Trp de la segunda serie inhiben la replicación de los virus EV71 y ECHO 11, pertenecientes a la familia de enterovirus. Tres de ellos, **30e**, **34** y **40**, presentan actividad submicromolar. Ante la novedad de este resultado decidimos estudiar en detalle el mecanismo de acción de estos compuestos.

Los ensayos de tiempo de adición indican que dichos compuestos actúan en etapas tempranas del ciclo viral del EV71.

La selección y caracterización de cepas virales resistentes mostró la presencia de las mutaciones Ser 184 Thr y Pro 246 Ser. Dichos aminoácidos están situados en la proteína VP1 de la cápsida del EV71 que es el primer punto de interacción con los receptores celulares. Dado que hasta el momento no se han descrito inhibidores eficaces frente a la replicación del EV71 consideramos que estamos ante un resultado de interés en el que pretendemos seguir trabajando.

Métodos Generales

MÉTODOS GENERALES DE SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

El seguimiento de las reacciones se ha realizado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de 0.2 mm de espesor, con gel de sílice de tipo 60, Merck F254. Los compuestos se detectaron con luz UV a 254 nm y/o mediante la utilización de reveladores químicos como ninhidrina en disolución de metanol al 2% o ácido fosfomolibdico en etanol al 5% y calefacción. El seguimiento de las reacciones también se ha realizado por HPLC-MS, mediante un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ.

El aislamiento y purificación de los productos de reacción se ha realizado por: i) cromatografía en columna con gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh), ii) mediante cromatografía circular centrífuga en capa fina (CCTLC) en un cromatotrón Harrison Research modelo 8924, en placas circulares de vidrio, con capas de gel de sílice 60 PF254 con CaSO_4 de 1 mm de espesor y flujo de 4-8 ml/min, iii) cromatografía flash (HPFC) en un instrumento Biotage Horizon. Los eluyentes empleados se indican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen:volumen.

Las reacciones en donde se ha calentado por irradiación de microondas se realizaron en un reactor de microondas monomodo EmrysTM Synthesizer (Biotage AB).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso y fueron registrados en un espectrómetro Varian UNIT INOVA-300 (a 300 y 75 MHz), Bruker AVANCE 300 (a 300 y 75 MHz), Varian INOVA-400 (a 400 y 100 MHz), Varian MERCURY-400 (a 400 y 100 MHz) y Varian-500 (a 500 y 125 MHz). Los espectros monodimensionales de ^1H y ^{13}C se obtuvieron utilizando condiciones estándar. En cada caso se han indicado los desplazamientos químicos (δ) en la escala ppm, la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; q, quintuplete; dd, doble doblete; m, multiplete), el número de protones (deducidos por la integral), el valor de las constantes de acoplamiento J (Hz) y la asignación estructural.

Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Hewlett-Packard LC/MS HP 1100 con una fuente de electrospray. Cuando fue requerida la masa exacta, los espectros se registraron en un Agilent Technologies 6520 Accurate-Mass QTOF LC/MS.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Mettler Toledo M170 y no están corregidos.

Los análisis elementales de los compuestos se hallan en el rango de ± 0.4 respecto a los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares y se han realizado en el laboratorio de microanálisis del C.N.Q.O. "*Lora Tamayo*" con un analizador Heareus CHN-O-RAPID y se expresan en tanto por ciento. Cuando el resultado del análisis elemental no fue satisfactorio, se determinó la masa exacta y el grado de pureza mediante HPLC en dos gradientes diferentes, mediante un cromatógrafo Waters 2690 empleando un detector de diodo array (230 a 400 nm) y una columna analítica Sunfire C18 de 3.5 μm (4.6 x 50 mm). La fase móvil empleada corresponde a mezclas de acetonitrilo con un 0.04% de TFA (disolvente A) y H₂O con un 0.05% de TFA (disolvente B), siendo la velocidad de flujo de 1ml/min. Los sistemas de gradientes empleados se describen a continuación: Sistema A: de un 10% a un 100% de disolvente A en 5 min y Sistema B: de un 10% a un 70% de disolvente A en 10 min. Para todos los compuestos analizados, la pureza fue mayor de un 95%.

Los productos finales obtenidos fueron liofilizados en un equipo Telstar 6-80.

ENSAYOS BIOLÓGICOS EN CULTIVO

Determinación de la actividad antiviral frente a VIH

Todos los ensayos biológicos frente a VIH han sido realizados por el equipo del Dr. Jan Balzarini en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica). El virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 VIH-1(III_B) fue proporcionado por el Dr. R. C. Gallo y el Dr. M. Popovic (Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, MD). Las células humanas linfocitos T, CEM, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivan en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Cambrex Bio Science Verviers S.p.r.l., Verviers, Belgium), 2 mM L-glutamina y 0.075 M NaHCO₃. Las células CEM se infectan con VIH como se describe a continuación: se suspenden células CEM (4.5 x 10⁵ células/ml) y se infectan con VIH-1 o VIH-2 a una concentración 100 veces superior a la dosis infectiva 50% (CCDI₅₀). La formación de células gigantes en células CEM inducida por VIH-1 se determina microscópicamente tras incubación a 37 °C durante 4 días. La

concentración efectiva 50% (CE_{50}) se define como la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la formación de sincitios y la concentración citotóxica 50% (CC_{50}) se define como la concentración de compuesto que se requiere para reducir en un 50% la proliferación celular.

Experimento de tiempo de adición

Este experimento también ha sido realizado por el equipo del Dr. Jan Balzarini en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica).¹ El virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 VIH-1(III_B) fue proporcionado por el Dr. R. C. Gallo y el Dr. M. Popovic (Institute of Human Virology, University of Maryland, Baltimore, MD. Las células MT-4 empleadas para llevar a cabo estos experimentos, se infectan con VIH-1 (III_B) y una multiplicidad de infección (MOI) de 0.5. Tras un periodo de adsorción de 1 hora, las células se lavan y se distribuyen en una placa de 96 pocillos (100.000 por pocillo) y se incubaron a 37°C. Se añadieron los distintos compuestos a evaluar y los compuestos de referencia a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 24, y 25h) tras la infección de las células. La determinación del nivel de actuación de los compuestos se lleva a cabo determinando el antígeno p24 (p24 es la principal proteína estructural del virión) mediante un ensayo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, en inglés) (Perkin Elmer, Bruselas, Bélgica) después de 31 horas tras la infección.

Determinación de la actividad antiviral frente a EV71

Todos los ensayos biológicos frente a EV71 han sido realizados por el equipo del Dr. Johan Neyts en el Instituto Rega de la Universidad Católica de Lovaina (Bélgica). El enterovirus 71 BRCR fue proporcionado por Aloys Tijsma. La actividad antiviral de los compuestos estudiados fue determinada empleando un ensayo de reducción CPE (efecto citopático) basado en MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)2H-tetrazolo, y fue expresada como CE_{50} (concentración efectiva 50) o la concentración de compuesto que inhibe el efecto citopático inducido por el virus en un 50%, siguiendo procedimientos descritos.² Las células fueron infectadas con una $CCID_{50}$ de 100, donde $CCID_{50}$ es el 50% de la dosis necesaria para infectar el cultivo celular. Después de un periodo de adsorción de dos horas a 37° C, el virus se eliminó y se añadieron los compuestos ensayados a distintas

concentraciones. Los cultivos fueron entonces incubados a 37°C durante 3 días, hasta que se observó una CPE completa en los cultivos infectados y en el cultivo control infectado por el virus pero no tratado por el compuesto (VC). Después se reemplazó el medio con CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación, citotoxicidad o quimiosensibilidad). Después de un periodo de incubación de 2 horas a 37° C se midió la densidad óptica de cada pocillo con un lector de microplacas a 490nm.

RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL

La proteína recombinante gp120 de VIH-1 III B (ImmunoDiagnostics Inc., Woburn, MA) producida en cultivo celular de ovarios de hámster chino, fue inmovilizada de manera covalente en la matriz de dextrano funcionalizada con ácidos carboxílicos de un chip sensor CM5 en acetato de sodio 10mM, y pH 4, usando un método estándar de acoplamiento de aminas. Se empleó una celda de referencia como control para interacciones no específicas y cambios en el índice de refracción. Todos los estudios de interacción fueron realizados a 25 °C en un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Los compuestos fueron disueltos en HBS-P (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,05% surfactante P20; pH 7.4), con un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) y Ca^{2+} (10 mM) a una concentración de 50 μM . Las muestras fueron inyectadas durante 3 minutos con un flujo 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ seguido de una fase de disociación de 5 minutos. Con el fin de eliminar la contribución del DMSO en la medida de la respuesta se emplearon correcciones para el DMSO. La superficie el chip CM5 fue regenerada con una inyección de NaOH (50 mM) durante 5 segundos con un flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

ENSAYOS DE OXIDACIÓN

Ensayo FRAP:

El ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) se utiliza para medir la capacidad reductora de los compuestos fenólicos por espectrofotometría mediante el método de Benzie y Strain con algunas modificaciones.³ Este método se basa en el aumento de la absorbancia del complejo tripiridiltriazina (TPTZ)-Fe(III) en presencia de agentes antioxidantes. A pH bajo, el

complejo formado por (TPTZ) y Fe(III) es reducido por los antioxidantes a su forma ferrosa Fe(II), desarrollando un intenso color azul con una absorción máxima a 595 nm (pH 3,6, 37°C).

El análisis se lleva a cabo en un lector de multiplacas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA), que permite el análisis automatizado de las muestras. Se preparan concentraciones conocidas de antioxidantes utilizando como disolvente metanol. En la placa de 96 pocillos se mezclan 10 μ L de muestra (Trolox, compuesto fenol o metanol como blanco), 30 μ L de agua destilada y 200 μ L de 0.3M tampón acetato, pH 3.6. El lector de multiplacas se programa para tomar lecturas cada 90 segundos durante 30 min a 595 nm después de la adición de 60 μ L de reactivo FRAP, el cual se prepara diariamente, mezclando 2.5 mL de disolución de reactivo TPTZ 10 mM en HCl 40 mM, 2.5 mL de FeCl₃·H₂O 20 mM y 7.5 mL de tampón acetato 0,3 M (pH 3,6). La temperatura se mantiene constante durante el experimento a 37°C. Todas las medidas se realizan por cuadruplicado. Como compuesto de referencia se emplea Trolox y los valores obtenidos se expresan como concentración equivalente de Trolox (ET, mM).

Método ABTS:

La capacidad de secuestro de radicales libres se determina espectrofotométricamente mediante el método de decoloración conocido por ABTS.⁴ Se basa en la disminución de la absorbancia a 730 nm del radical catión, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}), un cromóforo verde-azulado que se reduce en presencia de antioxidantes perdiendo color proporcionalmente a la cantidad presente del mismo. El ensayo se ha adaptado a un equipo de lector de multiplacas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) permitiendo un análisis automatizado de las muestras.

Primeramente, se prepara una disolución 7 mM del catión radical ABTS^{•+} en frasco topacio, mediante la oxidación de 38,6 mg de ABTS en 10 mL de una solución acuosa de persulfato potásico 2,45 mM, en ausencia de luz y baja agitación durante 12-16h. El catión radical ABTS^{•+} generado se diluye con metanol hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0.02$ en la placa de 96 pocillos a 730 nm junto con el resto de reactivos.

En la placa multipocillos se mezcla 10 μ L de compuesto (bien trolox o compuesto fenólico o metanol como blanco) y 230 μ L de metanol. El lector de multiplacas se programa para tomar lecturas cada 90 segundos durante 30 minutos a 730 nm después de adicionar 60

μL de reactivo ABTS⁺⁺. La temperatura se mantiene constante durante el experimento a 37°C. Cada determinación se realiza por cuadruplicado. Los resultados se expresan como concentración antioxidante equivalente de Trolox (ET, mM).

Método ORAC:

La capacidad de secuestro de radicales libres determinada mediante el ensayo ORAC (Oxygen Radical Scavenging Capacity) se basa en la pérdida de fluorescencia de una sustancia de referencia (fluoresceína) tras la adición de un radical peroxilo, 2,2'-azobis(2-amidino-propano) diclorhidrato (AAPH), que actúa como iniciador de la reacción oxidativa.⁵ En presencia de un antioxidante, esta pérdida de fluorescencia es menor cuanto más capacidad antioxidante tenga el compuesto a evaluar.

Se preparan concentraciones conocidas tanto del standard Trolox como de los antioxidantes objeto de estudio en tampón fosfato 75 mM pH 7,4. En cada pocillo se añade 150 μL de fluoresceína de concentración $8,5 \times 10^{-5}$ mM disuelto en tampón fosfato 75mM pH7,4 y 25 μL de Trolox o muestra a evaluar. El blanco se prepara con 150 μL de fluoresceína y 25 μL de tampón fosfato 75 mM pH 7,4. La placa así preparada se introduce en el lector de multiplacas (Bio-Tek, Winooski, VT, USA) previamente acondicionado a 37 °C. Seguidamente, se adicionan 30 μL de radical AAPH de concentración 153 mM preparado en tampón fosfato 75 mM a pH 7,4 a cada pocillo para dar comienzo a la reacción. Las lecturas se realizan cada 2 min durante 120 min a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 528 nm. Cada determinación se realiza por cuadruplicado. Los resultados se expresan como concentración antioxidante equivalente de Trolox (ET, mM).

BIBLIOGRAFÍA

1. Balzarini, J.; Naesens, L.; Slachmuylders, J.; Niphuis, H.; Rosenberg, I.; Holy, A.; Schellenkens, H. and De Clercq, E. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *AIDS* **1991**, 5 (1), 21-28.
2. Thibaut, H. J.; Leyssen, P.; Puerstinger, G.; Muigg, A.; Neyts, J.; De Palma, A. M. Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus infections. *Antiviral Research* **2011**, 90, 213-217.
3. Madrona, A.; Pereira, M. G.; Bravo, L.; Mateos, R.; Espartero, J. L. Preparation and antioxidant activity of tyrosyl and homovanillyl ethers. *Food Chemistry* **2011**, 129, 1169-1178.
4. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. and Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Bio. Med.* **1999**, 26 (9-10):1231-1237.
5. Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A. and Deemer, E.K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric Food Chem.* **2002**, 50 (7), 1815-1821.

